

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II

**“EFECTOS BIOLÓGICOS Y CARACTERIZACIÓN DE DIANAS DE
LA PROSTAGLANDINA A₁: INTERACCIONES CON PROTEÍNAS
DE FILAMENTOS INTERMEDIOS”.**

Memoria presentada por

Beatriz Garzón Fernández

para optar al título de Doctor

Trabajo realizado bajo la dirección de la **Dra. María Dolores Pérez-Sala Gozalo**,
en el Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Beatriz Garzón Fernández

Dra. M^a Dolores Pérez-Sala Gozalo

Directora

Dra. Margarita Fernández García de Castro

Tutora

**Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC
Madrid 2011**

A mis padres
A mis hermanos

RESUMEN

El metabolismo oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados origina una gran cantidad de especies electrófilas, entre las que se encuentran las prostaglandinas ciclopentenonas (cyPG), como son la 15d-PGJ₂ y la PGA₁. Estos compuestos se caracterizan por ser mediadores lipídicos implicados en numerosos procesos celulares y se ha descrito que ejercen efectos antiproliferativos, antiinflamatorios y antivirales. Parte de estos efectos biológicos son debidos a su reactividad específica que les permite modificar covalentemente proteínas celulares mediante la adición de Michael. La identificación de las dianas proteicas de las cyPG resulta esencial en el estudio de los mecanismos de acción que expliquen la actividad biológica de estas PG. Los análogos biotinilados de las cyPG han sido ampliamente utilizados como herramientas para la identificación de las proteínas modificadas por cyPG. Este trabajo se ha centrado en la validación del uso del derivado biotinilado de la PGA₁ para la identificación de las dianas biológicas de esta cyPG, así como en la confirmación de la modificación de determinadas proteínas celulares por la PGA₁-B. Además hemos caracterizado la modificación de proteínas que componen los filamentos intermedios del citoesqueleto, como la vimentina y las laminas nucleares, por cyPG biotiniladas como la 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación del programa de becas de Formación del Personal Investigador del Ministerio de Ciencia e Innovación, así como de los fondos de los proyectos de investigación SAF2006-03489 y SAF-2009-11642 del Ministerio de Ciencia e Innovación, y de la Red de Investigación de reacciones adversas a alérgenos y fármacos (RD07/0064/0007) del Instituto de Salud Carlos III.

En primer lugar quisiera agradecer la dirección de la Dra. Dolores Pérez-Sala, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio, así como por todas las horas dedicadas en enseñarme casi todo lo que sé de ciencia.

Esta tesis refleja el trabajo de muchas personas que han formado parte del laboratorio. Tengo que agradecer la inestimable ayuda de M^a Jesús todos estos años, el gran apoyo y amistad de Bea, sin la que el día a día no habría sido lo mismo, gracias por aguantarme tanto tiempo. Gracias también a Javi, Fran y Mónica, por todo lo que me enseñaron al principio, y por todo el apoyo y amistad que me han dado desde entonces. Gracias a Irene, Ruth y Clara, así como todas las personas con las que he compartido laboratorio durante estos años.

Durante el desarrollo de mi tesis doctoral he tenido la suerte de poder realizar dos magníficas estancias en laboratorios de los que he aprendido mucho. Tengo que agradecer al Dr. Vicente Andrés por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio en el Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), y especialmente a Jose María y a Ana, por introducirme en el mundo de las láminas y enseñarme tan pacientemente. Así como agradecer al Dr. Howard J. Worman por permitirme realizar una estancia en su laboratorio en el College of Physicians and Surgeons de la Universidad de Columbia de Nueva York, y en especial a Jason, por toda la atención que me prestó.

Quisiera agradecer la colaboración y ayuda de la Dra. Silvia Zorrilla, en el Instituto de Química-Física “Rocasolano” (CSIC) y de todo el personal de los numerosos servicios del CIB, como el de Cultivos Celulares, Proteómica, Citometría o Microscopía.

Durante todos estos años he hecho grandes amigos en el CIB, de los que nunca me olvidaré, y a los que debo muchos buenos momentos en este centro, como Leo, Marta, Yoli, María T, María R, Estefanía, Virginia, Eva, Gonzalo, Cris,... y en el IBV, Marian, Davi, Patri, Mariam, Rosa y Carlos. Gracias a Loli y Gisela por tener una sonrisa cada día, a mis vecinitos David, Óscar y Rosa, Sergio, Rubén, Virtu y a todos los que me han

Agradecimientos

hecho más llevaderas las esperas para revelar los WB, las horas dedicadas en cultivos y el trabajo diario en el CIB.

Quisiera dar las gracias a Miguel, por darme el empujón que necesitaba al principio, por toda su ayuda y su gran apoyo durante estos años. A Zaira, por ser tantas cosas a la vez, mi postdoc, mi compañera, mi amiga, y por no dejar de serlo nunca. A Arturo y a Nora, por ser tan buenos compañeros y cuidarme tanto.

Gracias a toda mi familia, por su gran apoyo, por darme ánimos siempre que lo he necesitado, por descubrir la ciencia conmigo, y por todo su cariño. A Esti, mis corazones contentos, y todos los demás amigos, por estar siempre ahí.

Un simple “gracias” no es suficiente para poder corresponder a mis padres todo lo que me han dado. Sin su amor, sacrificio y apoyo incondicional nunca habría logrado leer una tesis. A Gloria y a Víctor, mis hermanos, gracias por ser la base de mi vida, por nunca fallarme y por cuidarme siempre. A vosotros cuatro os dedico esta tesis, es toda vuestra.

ABREVIATURAS

15d-PGJ ₂	15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J ₂
15d-PGJ ₂ -B	15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J ₂ biotinilada
A488	Alexa Flúor 488
A594	Alexa Flúor 594
A633	Alexa Flúor 633
AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANS	Ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico
AP-1	Proteína 1 activadora
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CFP	Proteína fluorescente azul
COX	Ciclooxigenasa
cyPG	Prostaglandina ciclopentenona
DAPI	4',6- diamidino-2-fenilindol dicloridrato
DGLA	Ácido dihomo-gamma-linolénico
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECL	Sustrato quimioluminiscente
EDTA	Ácido disodio etilenodiaminotetraacético
EF-1 α	Factor de elongación 1 α
EF-2	Factor de elongación 2
EGTA	Ácido etileno bis(oxietilenonitrilo)tetraacético
eIF4A-1	Factor de iniciación eucariótico 4A-I
ERK-2	Proteína quinasa 2 regulada por señales extracelulares

Abreviaturas

FBS	Suero fetal bovino
FCS	Fracción citosólica soluble
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FNRE	Fracción nuclear resistente a la extracción
FNS	Fracción nuclear soluble
FR	Fracción retenida
GAPDH	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína fluorescente verde
GSH	Glutation
GST	Glutation S-Transferasa
HNE	4-Hidroxinonenal
HO-1	Hemooxigenasa 1
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HRP	Peroxidasa de rábano
HSF	Factor de choque térmico
Hsp	Proteína de choque térmico
IA-B	Iodacetamida biotinilada
IF	Filamentos intermedios
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP	Inmunoprecipitación
K _d	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
Keap-1	Proteína 1 similar a Kelch
KO	Bloqueo ("Knock out")
LBD-PPAR γ	Dominio de unión a ligandos de PPAR γ
LBPA	Ácido liso-bis-fosfatídico
LC	Cromatografía líquida
LDH	Lactato deshidrogenasa

LT	Lisado total
<i>m/z</i>	Cociente de masa/carga
MALDI	Ionización/desorción mediante láser, asistida por matriz
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MEF	Fibroblasto embrionario procedente de ratón
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MRP	Proteína de resistencia a fármacos
MS	Espectrometría de masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADPH	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato
NF-κB	Factor nuclear κB
NLS	Señal de localización nuclear
NO	Óxido nítrico
NP-40	Nonidet P-40
Nrf2	Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45
P100	Fracción de membrana
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Fosfato tampón salino
PG	Prostaglandina
PGA ₁	Prostaglandina A ₁
PGA ₁ -B	Prostaglandina A ₁ biotinilada
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR	Receptor activado por inductores de proliferación peroxisomal
PPRE	Elementos de respuesta a PPAR
PVDF	Polivinilideno de Flúor
px	Píxel
RMC	Células mesangiales de rata
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor de 9-cis retinoico
S100	Fracción citosólica

Abreviaturas

SDS	Dodecil sulfato de sodio
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
TAE	Tris acetato EDTA
TCEP	Tris-2-carboxietil-fosfina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamida
TEN	Tris EDTA tampón salino
TOF	Tiempo de vuelo
TR	Tiorredoxina reductasa
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Trx	Tiorredoxina
TTBS	Tween- Tris tampón salino
Tx	Tromboxanos
WB	Western Blot
WT	Silvestre (proteína o ADN)
ZLLL	Z-Leu-Leu-Leu-al
γ -GCS	γ -Glutamyl-cisteína-sintetasa
ΔG	Energía libre de Gibbs

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES	3
1.1 Modificaciones por lípidos electrófilos	3
2. LAS PROTAGLANDINAS	5
2.1 Síntesis de las prostaglandinas	5
2.1.1 Biosíntesis de las prostaglandinas de la serie 2	6
2.1.2 Biosíntesis de las prostaglandinas de la serie 1	8
2.1.3 Síntesis química de las prostaglandinas	8
2.2 Receptores de prostaglandinas	8
3. LAS PROTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS	9
3.1 Biosíntesis de las cyPG: detección <i>in vivo</i>	9
3.2 Mecanismos de acción de las cyPG	11
3.2.1 Acción vía receptores de membrana	11
3.2.2 Efectos de las cyPG dependientes de receptores nucleares	11
3.2.3 Regulación de expresión de genes independiente de receptor	12
3.2.3.1 Modificación de proteínas por cyPG: adición de Michael	13
3.2.3.2 Interacciones de las cyPG con factores de transcripción	15
3.3 Estudio de las modificaciones postraduccionales por las cyPG mediante abordajes proteómicos	18
3.4 Acciones biológicas de las cyPG	21
3.4.1 Efectos antiproliferativos	21
3.4.2 Efectos antivirales	22
3.4.3 Efectos antiinflamatorios	22
3.5 Relevancia de las prostaglandinas en terapéutica	23
4. CITOESQUELETO: LAS PROTEÍNAS DE FILAMENTOS INTERMEDIOS	25
4.1 La vimentina	27
4.2 Las laminas	28
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. REACTIVOS	37
1.1 Medios y reactivos para cultivos	37
1.2 Lípidos electrófilos	37
1.3 Ligandos de PPAR γ	37
1.4 Anticuerpos	37

1.4.1	Anticuerpos empleados en Western Blot e inmunoprecipitación	37
1.4.2	Reactivos empleados en inmunofluorescencia	38
1.5	Proteínas recombinantes	39
1.6	Plásmidos	39
1.6.1	Vectores de expresión de vimentina	39
1.6.2	Vectores de expresión de las laminas A y C	40
1.7	Oligonucleótidos	41
1.8	Reactivos de electroforesis	41
1.9	Otros reactivos	41
2.	MÉTODOS	42
2.1	Cultivos celulares	42
2.2	Tratamientos celulares con cyPG	42
2.3	Ensayos de viabilidad celular	42
2.4	Transfecciones	43
2.4.1	Transfecciones transitorias	43
2.4.2	Transfecciones estables	43
2.5	Western Blot	44
2.6	Fraccionamiento celular citosol/membrana	44
2.7	Fraccionamiento subcelular de células MEFs y U2OS	45
2.8	Extracción <i>in situ</i> de la matriz nuclear	45
2.9	Isotermas de unión de LBD-PPAR γ a ANS y ensayos de competición de ligandos	46
2.10	Ensayos de competición de ligandos de LBD-PPAR γ en gel	46
2.11	Unión de PG biotiniladas a LBD-PPAR γ <i>in vitro</i>	47
2.12	Ensayos de pulso-caza	47
2.13	Purificación de proteínas marcadas con PGA $_1$ -B mediante cromatografía en resina de avidina-agarosa	48
2.14	Modificación de vimentina recombinante <i>in vitro</i>	48
2.15	Modificación de proteínas diana para la modificación por PGA $_1$ -B <i>in vitro</i>	49
2.16	Inmunoprecipitación de proteínas	49
2.17	Microscopía de fluorescencia	50
2.17.1	Estudio de la vimentina	50
2.17.1.1	Ensayos de inmunofluorescencia para el estudio de la vimentina	50
2.17.2	Estudio de las laminas A y C	51
2.17.2.1	Ensayos de inmunofluorescencia para el estudio de las laminas	51
2.18	Análisis estadístico	52

RESULTADOS	53
1. ESTABILIDAD DE LA MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES POR cyPG	55
2. ESTUDIO DE LA UNIÓN DE cyPG AL DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDOS DE PPAR γ	58
2.1 Ensayo de competición de ligandos de LBD-PPAR γ basado en la emisión de fluorescencia	58
2.2 Ensayo de competición en gel de ligandos de LBD-PPAR γ con iodacetamida biotinilada	60
2.3 Caracterización de la unión de 15d-PGJ ₂ -B y PGA ₁ -B a LBD-PPAR γ	62
3. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA PGA ₁ Y SU ANÁLOGO BIOTINILADO	63
3.1 Efectos sobre la viabilidad celular	64
3.2 Efecto de la PGA ₁ y la PGA ₁ -B sobre los niveles de hemooxigenasa 1	65
3.3 Efecto de la PGA ₁ y la PGA ₁ -B sobre los niveles de γ -glutamyl-cisteína sintetasa	66
4. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA PARA LA MODIFICACIÓN POR PGA ₁ y PGA ₁ -B	67
4.1 Validación de dianas mediante el análisis de las fracciones obtenidas tras la cromatografía en avidina	70
4.2 Confirmación de la modificación de las proteínas identificadas mediante ensayos de inmunoprecipitación	71
4.3 Ensayos <i>in vitro</i> con proteínas recombinantes	72
5. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE LA VIMENTINA POR PGA ₁ -B	74
5.1 Modificación de la vimentina recombinante <i>in vitro</i>	74
5.2 Identificación del residuo de unión covalente de PGA ₁ -B	75
5.3 Enriquecimiento de péptidos modificados mediante cromatografía en resina de avidina-agarosa	77
5.4 Confirmación de la unión de PGA ₁ -B al residuo de cisteína 328 de la vimentina en células intactas	80
5.5 Estudio de la importancia funcional del residuo de cisteína 328 de la vimentina en células intactas	81
6. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE LAS LAMINAS A Y C POR cyPG BIOTINILADAS	85
6.1 Colocalización de las laminas y proteínas modificadas por las cyPG en la envuelta nuclear	85

6.2	Localización subcelular de las laminas A y C y de las proteínas modificadas por las cyPG biotiniladas	94
6.3	Modificación covalente de las laminas A y C por cyPG biotiniladas	96
6.4	Importancia del residuo de cisteína 522 de las laminas A y C en la modificación por cyPG biotiniladas	98
DISCUSIÓN		101
1.	ESTABILIDAD DE LA MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES POR cyPG	103
2.	ESTUDIO DE LA UNIÓN DE cyPG AL DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDOS DE PPAR γ	106
3.	EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA PGA $_1$ Y SU ANÁLOGO BIOTINILADO	108
4.	CONFIRMACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA PARA LA MODIFICACIÓN POR PGA $_1$ Y PGA $_1$ -B	111
5.	ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FILAMENTOS INTERMEDIOS POR cyPG	115
5.1	Caracterización de la modificación de la vimentina por PGA $_1$ -B	116
5.2	Estudio de la modificación de las laminas A y C por las cyPG biotiniladas	119
CONCLUSIONES		125
BIBLIOGRAFÍA		129
ANEXO		145

INTRODUCCIÓN

1. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

La compleja fisiología de las células eucarióticas está regulada por numerosos mecanismos entre los que se incluyen la transcripción de nuevos ARN mensajeros (ARNm), el procesamiento alternativo de ARNm, la traducción de proteínas y las alteraciones postraduccionales de las mismas, que en su conjunto constituyen un complejo entramado de regulación continua en la célula.

Las modificaciones postraduccionales de proteínas engloban más de 200 reacciones descritas hasta ahora, y consisten en la adición covalente de un grupo modificante, la alteración química o la pérdida de péptidos de su estructura (Mann y Jensen, 2003).

La gran diversidad de modificaciones constituye un mecanismo de regulación dinámica de la funcionalidad de las proteínas, de su actividad y de su localización subcelular, y les confiere un papel central en la señalización celular. Una proteína puede ser diana de más de una modificación, o ser modificada en múltiples residuos. Dichas modificaciones pueden producirse separadas en el tiempo, o de forma secuencial en un mismo residuo de la proteína. Algunas modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, la formación de puentes disulfuro o la modificación por ciertos lípidos, pueden ser estables y estar involucradas en la maduración, correcto plegamiento y localización de las proteínas recién sintetizadas. Otras, como la fosforilación, son más transitorias y son esenciales en la señalización celular (Deribe *et al.*, 2010).

Pueden establecerse numerosas clasificaciones de estas modificaciones postraduccionales, siguiendo diversos criterios. Nuestro interés se ha centrado en las modificaciones producidas por lípidos electrófilos, más concretamente, en las producidas por eicosanoides electrófilos con estructura ciclopentenona.

1.1 MODIFICACIONES POR LÍPIDOS ELECTRÓFILOS

Durante el metabolismo celular, en determinadas situaciones patológicas, así como durante el envejecimiento o estrés oxidativo, se generan productos de peroxidación lipídica (Berlett y Stadtman, 1997; Bogatcheva *et al.*, 2005). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) reaccionan con lípidos celulares de forma directa o

indirecta, generando una amplia variedad de productos, muchos de los cuales contienen grupos funcionales capaces de modificar proteínas. Los lípidos oxidados pueden desencadenar la activación de vías de señalización siguiendo diversos mecanismos, como la unión a receptores, la modificación directa de proteínas, la formación de ROS/RNS intracelulares o cambios en el flujo de Ca^{2+} celular (Zmijewski *et al.*, 2005).

Los compuestos electrófilos pueden producirse endógenamente, provenir de la dieta, o generarse por el metabolismo de xenobióticos. Si nos centramos en los electrófilos endógenos generados por la oxidación lipídica, numerosas especies electrófilas se producen a partir de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que son muy susceptibles de sufrir oxidaciones mediante mecanismos enzimáticos o no enzimáticos (Ceaser *et al.*, 2004).

Los lípidos oxidados pueden dar lugar a aductos con proteínas mediante la formación de bases de Schiff entre aldehídos lipídicos y grupos nucleófilos de las proteínas como las lisinas o las histidinas (Isom *et al.*, 2004; Uchida, 2003). También pueden reaccionar mediante la adición de Michael, que consiste en el ataque de residuos nucleófilos como los presentes en cisteínas o histidinas de las proteínas a carbonos electrófilos de compuestos con grupos carbonilos α,β -insaturados (Zmijewski *et al.*, 2005). Este grupo funcional está presente en aldehídos reactivos derivados de la fragmentación de PUFA, como el 4-hidroxinonenal (HNE) o la acroleína (Uchida, 2000). Estos aldehídos generados endógenamente están involucrados en diversas funciones biológicas (Dianzani, 2003), pero también en la fisiopatología asociada a las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis y las complicaciones derivadas de la diabetes. El HNE, por ejemplo, se genera a concentraciones elevadas en situaciones de estrés oxidativo, y está implicado en patologías como el Alzheimer (Uchida, 2000).

La estructura de carbonilo α,β -insaturado también está presente en las prostaglandinas ciclopentenonas, que se generan por la deshidratación de las prostaglandinas, que a su vez son productos derivados del ácido araquidónico (AA) por vía de las ciclooxigenasas. Los isoprostanos son isómeros estructurales de las prostaglandinas que también pueden poseer un carbonilo α,β -insaturado en su estructura (Chen *et al.*, 1999a; Chen *et al.*, 1999b; Hardy *et al.*, 2011). Son productos de la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico y de lípidos relacionados llevada a cabo por la acción de radicales libres, y pueden alcanzar altos niveles en determinadas condiciones de estrés oxidativo (Roberts y Morrow, 1994).

2. LAS PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas (PG) son una familia de moléculas biológicamente activas que poseen un amplio rango de acciones dependiendo del tipo de PG y de la célula diana. Desde que Ulf von Euler descubriera que los extractos lipídicos del semen humano contenían compuestos activos sobre la contracción del músculo liso y presión sanguínea, el interés en la investigación de estos compuestos fue incrementándose. Las primeras determinaciones estructurales fueron publicadas a finales de la década de los años 50, bajo la dirección de Sune Bergström y Bengt Samuelsson, cuyas investigaciones sobre las PG y sustancias relacionadas fueron premiadas con el premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1982, compartido con John R. Vane. El interés de la industria farmacéutica hacia esta familia de compuestos alcanzó su máximo cuando Vane descubrió que la inhibición de las enzimas implicadas en la biosíntesis de las prostaglandinas era uno de los mecanismos de acción del ácido acetil salicílico y compuestos relacionados (Mathews y Van Holde, 2000).

2.1 SÍNTESIS DE LAS PROSTAGLANDINAS

Las PG se forman en la mayoría de las células del organismo y actúan como mediadores lipídicos con acción autocrina o paracrina. No son almacenadas sino sintetizadas *de novo* a partir de los ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos (ácidos eicosaenoicos), como son los ácidos araquidónico (AA, 20:4 n-6), dihomo-gamma-linolénico (DGLA, 20:3 n-6) y el eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3).

Las PG se clasifican en diversas series dependiendo del ácido eicosaenoico precursor que les confiere un determinado número de dobles enlaces en su estructura. Las prostaglandinas más abundantes son las que proceden del AA, constituyendo la serie 2, ya que contienen dos dobles enlaces en su estructura. Las PG de la serie 1 proceden del DGLA, mientras que el EPA es el precursor de la serie 3.

La ruta de biosíntesis mejor estudiada es la derivada del AA. Cabe destacar que el AA es una fuente de numerosos metabolitos que componen toda una cascada de compuestos biológicamente activos. Las tres mayores rutas de su metabolismo incluyen la oxigenación por la acción enzimática de ciclooxygenasas, lipooxygenasas o citocromo P450 monooxygenasas. Estas vías dan lugar a la formación de prostanoides, leucotrienos, lipoxinas, ácidos hidroxieicosatetranoicos y ácidos epoxieicosatrienoicos.

(Bogatcheva *et al.*, 2005). La peroxidación no enzimática del AA en situaciones de estrés oxidativo genera los isoprostanos. Estos compuestos a su vez pueden ser precursores de las PG por una vía independiente de las COX, ya que se ha descrito que algunas de las PG de la serie 2, como las PGE_2 y PGD_2 , pueden ser generadas *in vivo* mediante la epimerización de los análogos isoprotanos de estas PG (Gao *et al.*, 2003).

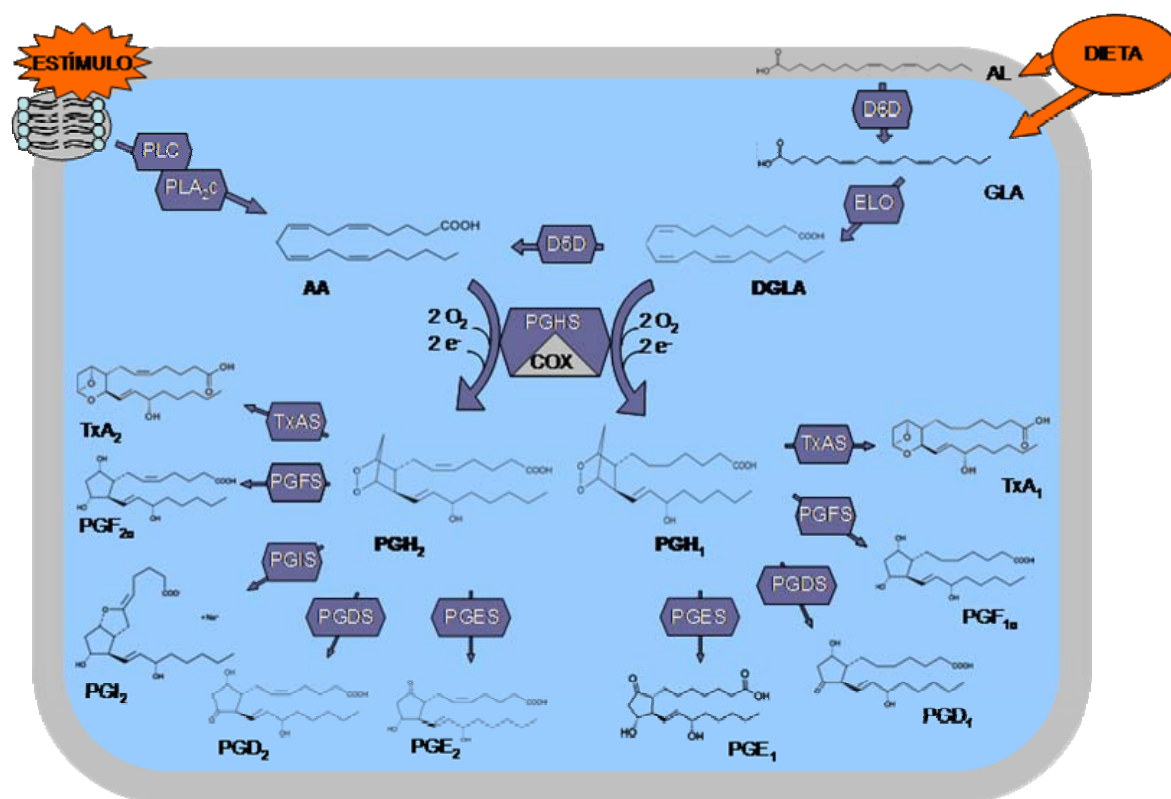


Figura 1. Vía de biosíntesis de las PG de la serie 2 y 1. El AA (ácido araquidónico) liberado de las membranas plasmáticas es el ácido graso precursor de los prostanoideos de la serie 2. El DGLA (dihomo-gamma-linolénico), originado de la metabolización del GLA (ácido gamma-linolénico) ingerido de la dieta o procedente de la ruta del AL (ácido linoleico), es el precursor de los prostanoideos de la serie 1. Además, en el organismo, existe una ruta de metabolización del DGLA a AA por la acción de la Δ^5 -desaturasa (D5D). Ambos ácidos grasos precursores, por la acción de la PGHS (PGH sintasa o ciclooxigenasa, COX), dan lugar a la PGH_2 o la PGH_1 , de las que derivan el resto de prostanoideos de ambas series por la acción de las PG sintasas (PGFS, PGIS, PGDS, PGES), o TxA sintasa (TxAS).

2.1.1 Biosíntesis de las prostaglandinas de la serie 2

La ruta de biosíntesis de las PG de la serie 2 comienza con la liberación del AA integrante de las membranas plasmáticas por acción de la fosfolipasa A2 citosólica (PLA_2c) o la fosfolipasa C (PLC) en respuesta a estímulos específicos en los tejidos, como son determinadas hormonas como la bradiquinina, o proteasas como la trombina. El AA liberado es metabolizado por la prostaglandina H sintasa (PGHS) en el retículo endoplásmico y membrana nuclear, y esta reacción es la etapa limitante de la ruta de

biosíntesis. Esta enzima cataliza dos oxigenaciones secuenciales, originando el compuesto intermedio PGG_2 , que es finalmente reducido a PGH_2 . Este producto de reacción se caracteriza por ser un endoperóxido de prostaglandina precursor del resto de PG y tromboxanos, conocidos en conjunto como prostanoides (Funk, 2001; Bogatcheva *et al.*, 2005) (Figura 1).

La enzima PGHS es conocida comúnmente como ciclooxigenasa (COX), y existen 3 isoformas de la misma enzima. Mientras que las funciones de COX-1 y COX-2 han sido ampliamente estudiadas, la isoforma COX-3 es menos conocida, y se expresa en determinados tejidos como cerebro y médula espinal. Las estructuras cristalográficas de COX-1 y COX-2 son muy similares, aunque la COX-2 posee un bolsillo más grande para el reconocimiento de sustratos. La COX-1 se expresa de forma estable a niveles bajos en numerosos tipos celulares y tejidos, lo que asegura una producción constante de PG, cuya función es considerada homeostática ya que contribuye al mantenimiento de funciones fisiológicas importantes como la agregación plaquetaria, el balance hídrico y la protección de la mucosa gástrica. Por otra parte, los niveles de COX-2 son casi indetectables de forma constitutiva, pero se incrementan de forma transitoria en respuesta a agentes externos como agentes patógenos, lo que conlleva una elevada producción de PG en un periodo de tiempo limitado. La expresión de COX-2 se ha definido como fisiopatológica, ya que forma parte de la respuesta protectora frente a situaciones patológicas, pero cuando escapa del control fisiológico, puede contribuir a la patogenia de desórdenes severos tales como las enfermedades autoinmunes y el cáncer (Cerella *et al.*, 2010).

La tercera fase de la ruta de biosíntesis de PG es dependiente del tipo celular, ya que una serie de sintasas específicas convierten a la PGH_2 en el resto de PG y en tromboxano A_2 (TxA_2). La tromboxano A sintasa (TxAS) se encuentra en plaquetas y macrófagos. La prostaciclina sintasa (PGIS) se expresa en células endoteliales y la PGF sintasa (PGFS) en útero, mientras que dos tipos de PGD sintasa (PGDS) se encuentran en cerebro y mastocitos respectivamente. Las PGE sintasas (PGES) presentes en numerosos tipos celulares catalizan la síntesis de PGE_2 .

La activación de vías de señalización específicas de cada tipo celular conduce a la síntesis de determinadas clases de PG y por tanto, desencadena diferentes respuestas celulares (Funk, 2001).

2.1.2 Biosíntesis de las prostaglandinas de la serie 1

En el caso de las PG de la serie 1, caracterizadas por poseer un doble enlace en su estructura, el ácido precursor es el DGLA (Nugteren y Hazelhof, 1973). La ruta más estudiada en la generación de PG de esta serie es la que deriva del ácido graso esencial linoleico (LA) procedente de la dieta. Este ácido se convierte en el organismo en ácido gamma-linolénico (GLA) por acción de la Δ^6 -desaturasa (D6D), aunque éste también puede ser ingerido en la dieta. El GLA es metabolizado a DGLA por la elongasa (ELO), y de él deriva el resto de prostanoides de la serie 1. Por la acción de la COX se sintetiza la PGH_1 , que análogamente a la PGH_2 , es el compuesto del que derivan todas las PG de la serie así como el tromboxano A_1 (TxA_1) por la acción de las PG sintasas, TxA sintasa y diversas isomerasas (Levin *et al.*, 2002; Miyamoto *et al.*, 1974) (Figura 1).

Recientemente se ha descubierto en el tejido de la epidermis una ruta de biosíntesis de PG de la serie 1 que se induce cuando se alcanzan niveles altos de DGLA en ese tejido. El DGLA es metabolizado por la vía de la COX epidérmica a PGE_1 y por la 15-lipooxigenasa a ácido 15-hidroxi-eicosatrienoico (15-HETrE). Estos prostanoides son responsables, al menos en parte, de la actividad antiinflamatoria descrita para el aceite de onagra usado en clínica para el tratamiento de desórdenes hiperproliferativos de la piel (Ziboh *et al.*, 2000).

2.1.3 Síntesis química de las prostaglandinas

Cabe destacar el impulso que supuso en el estudio de las PG el desarrollo de la síntesis orgánica de las mismas, llevada a cabo en primer lugar por Corey (Corey *et al.*, 1968). Este avance contribuyó enormemente a la producción comercial de PG de gran interés terapéutico. Más tarde se desarrollaron métodos de síntesis en un solo paso (Noyori y Suzuki, 1993), que permitieron la síntesis de PG naturales y derivados de éstas, incluyendo a las prostaglandinas ciclopentenonas.

2.2 RECEPTORES DE PROSTAGLANDINAS

Las PG son liberadas por las células mayoritariamente mediante transporte facilitado a través de un transportador de PG, y potencialmente por otros transportadores no caracterizados (Schuster, 1998). Estos compuestos actúan de forma autocrina o paracrina, uniéndose a receptores en la superficie de las células diana y desencadenando diversas acciones biológicas.

Se conocen 9 formas de receptores de PG en humanos pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G: EP1- EP4, que unen PGE_2 , DP1 y DP2 que unen PGD_2 , y los receptores que unen $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 y TXA_2 , llamados FP, IP y TP respectivamente. A excepción de DP2 (también denominado CRTH2), que es miembro del subgrupo de receptores quimiotácticos, el resto se agrupan dentro de la familia de receptores de prostanoïdes. Los denominados receptores relajantes IP, DP1, EP2 y EP4, poseen una vía de señalización mediada por el incremento en adenosina monofosfato cíclico intracelular (AMPc). En el caso de los receptores contráctiles EP1, FP y TP, sin embargo, la señalización está mediada por el incremento en el calcio intracelular. Los receptores EP3 y DP2 son considerados como unos receptores inhibitorios que desencadenan descensos en la formación de AMPc (Narumiya, 2009).

La naturaleza de las respuestas celulares desencadenadas por los prostanoïdes depende en gran medida del tipo celular y de la expresión de los receptores en las células diana. Un mismo prostanoïde puede ejercer distintos efectos dependiendo del tipo celular diana. PGE_2 desencadena efectos relajantes cuando se une a receptores EP2 y EP4, pero cuando se une a EP1 produce contracción del músculo liso vascular (Norel, 2007). Asimismo, la activación de un mismo receptor puede desencadenar diversas respuestas dependiendo del contexto en el que esté produciendo la activación. Así, el receptor EP4 desencadena acciones antiinflamatorias en modelos de inflamación intestinal, mientras que puede ejercer efectos proinflamatorios en artritis (Narumiya, 2009).

3. LAS PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS

Las prostaglandinas ciclopentenonas (cyPG) son mediadores endógenos electrófilos implicados en la resolución de la inflamación y en el control de la proliferación celular, y debido a sus efectos antiinflamatorios, antiproliferativos y antivirales en determinados modelos experimentales, las cyPG se han considerado potencialmente como compuestos de interés en terapéutica.

3.1 BIOSÍNTESIS DE LAS cyPG: DETECCIÓN *IN VIVO*

Las cyPG son eicosanoides endógenos formados por deshidratación espontánea de otras prostaglandinas. Las prostaglandinas de la serie A se forman por deshidratación del anillo de ciclopentano de la PGE, mientras que las prostaglandinas de la serie J se forman por deshidratación de la PGD_2 (Straus y Glass, 2001). Nuestro interés se ha centrado en la

prostaglandina A₁ (PGA₁), que procede de la deshidratación de la PGE₁, y en la prostaglandina 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂), detectada por primera vez como un producto de la transformación de PGD₂ *in vitro* catalizada por la albúmina (Fitzpatrick y Wynalda, 1983) (Figura 2).

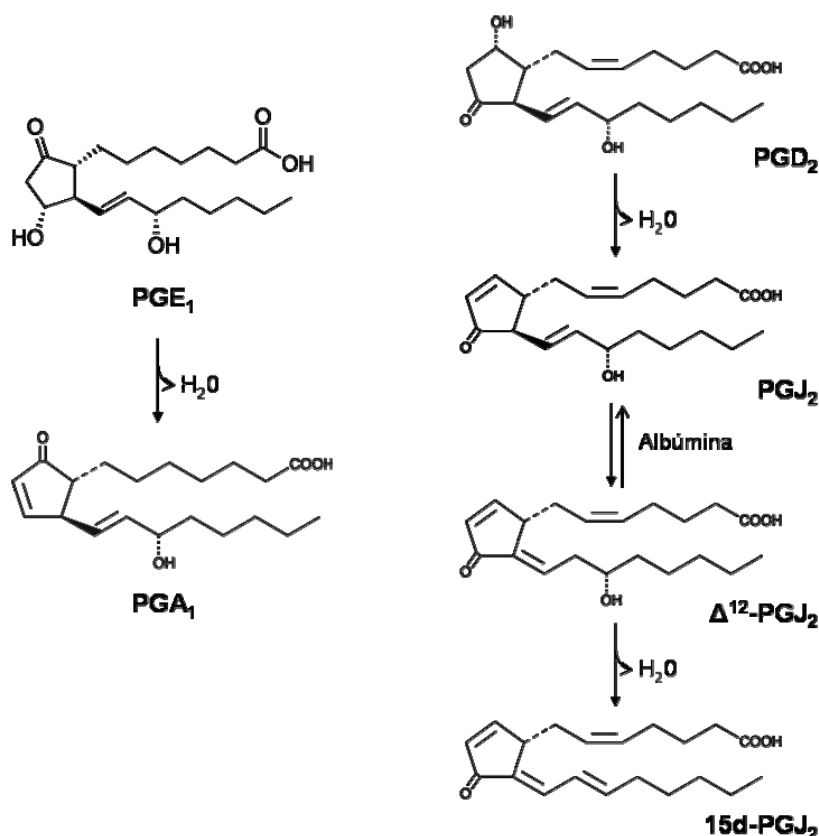


Figura 2. Formación de las prostaglandinas ciclopentenonas. La PGA₁ se origina por la deshidratación del anillo de ciclopentano de la PGE₁. La PGD₂ tras la deshidratación e isomerización dependiente de albúmina se transforma en la Δ^{12} -PGJ₂. La 15d-PGJ₂ se forma por la deshidratación de Δ^{12} -PGJ₂.

Las cyPG han sido detectadas en múltiples fluidos biológicos y tejidos. Usando un radioinmunoensayo específico para la PGA₁, se pudo determinar que los niveles de esta PG eran de $2,5 \pm 1,6$ ng/100 ml en suero humano (Zia *et al.*, 1975). Esta concentración es menor que la requerida para inducir efectos biológicos en modelos experimentales, pero es posible que sea una subestimación de la concentración real ya que PGA₁ es muy inestable en suero (Suzuki *et al.*, 1997a). Usando ensayos inmunoenzimáticos, se identificó 15d-PGJ₂ en fluidos inflamatorios y se ha demostrado que los niveles de este compuesto aumentan durante la fase de resolución de la inflamación (Gilroy *et al.*, 1999). Se han descrito niveles suficientemente altos de esta cyPG como para ejercer efectos *in vivo* (Rajakariar *et al.*, 2007).

3.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS cyPG

Las cyPG pueden desencadenar sus efectos mediante diversos mecanismos de acción, lo que las diferencia del resto de PG. Las cyPG pueden activar receptores de membrana y receptores nucleares, y debido a su reactividad específica, también pueden interactuar con moléculas de señalización como algunas proteínas y factores de transcripción.

3.2.1 Acción vía receptores de membrana

Tal y como está descrito para las PG, las cyPG pueden interactuar con receptores de membrana acoplados a proteínas G. Diversas cyPG de la serie J se unen al receptor DP2 con constantes de disociación en el rango nanomolar (Sawyer *et al.*, 2002). La activación de DP2 interviene en la quimiotaxis de los leucocitos y en la inflamación alérgica (Narumiya, 2009).

Se ha descrito que mientras la PGD₂ se une con afinidad similar a DP1 y DP2, la Δ^{12} -PGJ₂ y la 15d-PGJ₂ se unen preferentemente a DP2 (Gazi *et al.*, 2005). La afinidad de la Δ^{12} -PGJ₂ y la 15d-PGJ₂ por el receptor DP1 es menor que la de la PGD₂ (Wright *et al.*, 1998), pero en el caso del receptor DP2, se ha descrito que la 15d-PGJ₂ posee una afinidad mayor que PGD₂ (Hata *et al.*, 2003). Es posible que algunos de los efectos secundarios de los compuestos de la serie A y J observados *in vivo* sean debidos a la unión a estos receptores (Straus y Glass, 2001).

Algunas cyPG pueden modificar covalentemente otros receptores de membrana. Se ha descrito que el canal iónico TRPA1, expresado mayoritariamente en neuronas nociceptivas, se modifica covalentemente y es activado por 15d-PGJ₂ (Takahashi *et al.*, 2008).

3.2.2 Efectos de las cyPG dependientes de receptores nucleares

Los PPAR (receptores activados por inductores de la proliferación peroxisomal) son receptores nucleares implicados en la regulación de la inflamación y del metabolismo lipídico. La familia de los PPAR incluye los subtipos α , δ y γ (Fruchart *et al.*, 1999; Kersten *et al.*, 2000). Forman heterodímeros con el receptor de ácido retinoico (RXR) y activan la expresión de genes por la unión a elementos DR-1 (de respuesta a PPAR, PPRE) en el ADN. Desempeñan un papel importante en la diferenciación de preadipocitos a adipocitos (Rosen *et al.*, 2000).

Diversos fármacos como la troglitazona y la rosiglitazona, fármacos antidiabéticos, son agonistas de PPAR γ y han sido utilizados en el tratamiento de la diabetes (Ricote *et al.*, 1999; Rocchi y Auwerx, 1999). Estos fármacos se unen a PPAR γ en un bolsillo del dominio de unión a ligandos (LBD) mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre el anillo de su estructura y los residuos de histidina en posición 323 y 449 de la proteína (Nolte *et al.*, 1998). En 1995 se descubrió que la 15d-PGJ₂ era un ligando de PPAR γ (Forman *et al.*, 1997), y la Δ^{12} -PGJ₂ también se une a PPAR γ pero con menor afinidad (Kliwer *et al.*, 1995). La 15d-PGJ₂ y otros derivados de ácidos grasos endógenos actúan como ligandos de PPAR γ y forman un aducto covalente con una cisteína presente en el dominio de unión a ligandos del factor, la C285. Esta interacción es importante para que el receptor adopte su conformación activa (Shiraki *et al.*, 2005; Waku *et al.*, 2009a).

La 15d-PGJ₂ también activa PPAR α y PPAR δ , aunque de forma menos potente que PPAR γ (Forman *et al.*, 1997). Se ha descrito que la PGA₁ y PGA₂ activan PPAR α y δ , aunque son necesarias concentraciones altas para desencadenar esta respuesta (Yu *et al.*, 1995). La unión de los ligandos a PPAR γ conlleva la activación de la transcripción de genes que contienen elementos DR-1 en su promotor, implicados en muchos casos en el metabolismo lipídico (Rosen *et al.*, 2000). En macrófagos activados, la unión de 15d-PGJ₂ y ligandos sintéticos a PPAR γ induce una inhibición de las actividades de los factores de transcripción AP-1, STAT y NF- κ B que conlleva una represión de la expresión génica de la iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) o de la gelatinasa B (Ricote *et al.*, 1998).

La implicación de PPAR γ en los efectos de las cyPG y otros agonistas ha sido estudiada en una amplia variedad de células, observándose que algunas respuestas eran desencadenadas en células que aparentemente no expresan PPAR γ , y más recientemente, también han sido empleadas técnicas de supresión de PPAR γ por ARNi (Ghosh *et al.*, 2009) y abordajes empleando análogos químicos de cyPG (Sanchez-Gomez *et al.*, 2004). En estos trabajos se ha demostrado que tanto las cyPG como otros agonistas de PPAR γ pueden ejercer efectos independientes de PPAR γ .

3.2.3 Regulación de expresión de genes independiente de receptor

Varios miembros de la familia de las cyPG han demostrado actividades antiproliferativas, antiinflamatorias y antivirales, que en parte son debidas a acciones independientes de receptores. Al contrario que otras PG, gran parte de las acciones de las cyPG son debidas a la capacidad de interaccionar con dianas celulares específicas, incluyendo moléculas de señalización y factores de transcripción (Straus y Glass, 2001).

3.2.3.1 Modificación de proteínas por cyPG: adición de Michael

Estructuralmente, las cyPG se caracterizan por poseer un grupo carbonilo α,β -insaturado en el anillo de ciclopentano. Esto le confiere al carbono en posición β una reactividad electrófila, y por tanto es susceptible de ser atacado por grupos nucleófilos mediante la reacción conocida como adición de Michael. (Figura 3). Estos nucleófilos pueden ser grupos de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen las proteínas celulares como los grupos sulfhidrilo o amino, o también grupos de tioles solubles, como el glutatión (GSH) (Yamaguchi *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos, esta modificación postraduccional es no enzimática, aunque existen enzimas que pueden catalizarla, como la glutatión S-transferasa (GST), que cataliza la conjugación de las cyPG con el GSH y también cataliza las reacciones de metabolización de un gran número de electrófilos xenobióticos (Atsmon *et al.*, 1990; Cagen *et al.*, 1975). La conjugación con GSH es un mecanismo de eliminación de compuestos electrófilos, y se ha demostrado que esta eliminación se produce mediante las proteínas de resistencia a fármacos (MRP1 y MRP2) (Akimaru *et al.*, 1996; Evers *et al.*, 1997; Ishikawa *et al.*, 1998).

No todas las cisteínas presentes en las proteínas son susceptibles de modificación por cyPG. En la reacción están implicados diversos factores, como la estructura de la proteína, la naturaleza de los aminoácidos cercanos al grupo nucleófilo, el pH del entorno o los factores estéricos. Cabe destacar que la estabilidad del aducto formado depende de la estructura de la cyPG y del grupo nucleófilo implicado. La conjugación con GSH es reversible, mientras que la modificación de polipéptidos se considera irreversible en condiciones fisiológicas (Noyori y Suzuki, 1993). A su vez, la modificación puede ser más o menos estable dependiendo de si la cyPG es una enona simple o posee estructura dienona. Ensayos con derivados de cyPG demostraron que estructuras dienonas, como la Δ^{12} -PGJ₂ o Δ^7 -PGA₁ metil éster se unen de forma reversible a GSH, mientras que la enona simple PGA₁ metil éster forma aductos más estables (Suzuki *et al.*, 1997b).

Las primeras evidencias de la unión covalente de cyPG a proteínas se obtuvieron mediante el empleo de prostaglandinas marcadas radiativamente. En estos estudios se descubrió que dichos compuestos podían tener diferente distribución intracelular y distinta estabilidad en la unión a estructuras celulares dependiendo de su estructura enona o dienona (Narumiya *et al.*, 1987). Más tarde, en experimentos llevados a cabo con células incubadas con análogos biotinilados de cyPG, se observó la presencia de polipéptidos celulares que habían incorporado biotina a sus estructuras (Parker, 1995).

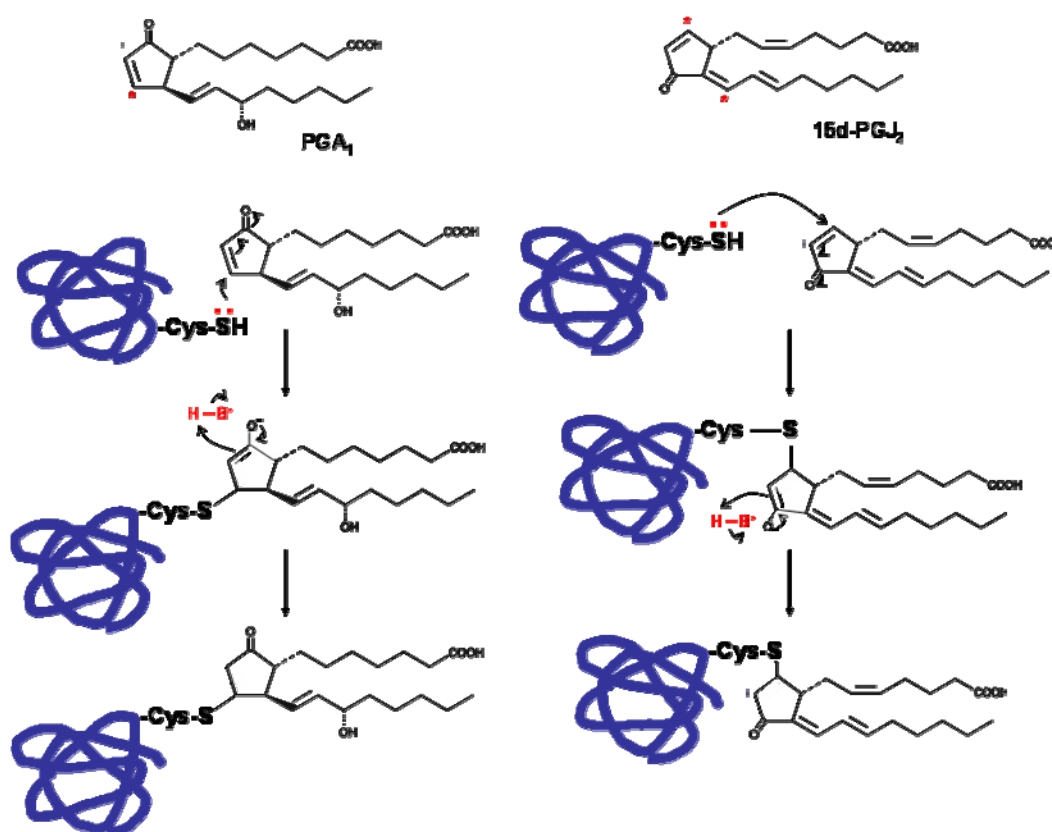


Figura 3. Modificación covalente de proteínas por cyPG. Se muestran la PGA₁ y 15d-PGJ₂, así como la posición de los carbonos electrófilos en posición β respecto al grupo carbonilo, señalados con asteriscos. Estos carbonos reactivos son susceptibles al ataque nucleófilo de grupos tioles de las proteínas, desencadenando la adición de Michael, cuya reacción se detalla.

Estudios recientes de nuestro grupo han demostrado que los patrones de modificación de polipéptidos celulares por iodacetamida biotinilada y por el análogo biotinilado de 15d-PGJ₂ (15d-PGJ₂-B) son diferentes (Sanchez-Gomez *et al.*, 2004), lo cual indica que la reactividad de las cyPG es diferente de la de un reactivo general de tioles. Es importante destacar la presencia de patrones diferentes, pues indica que no todos los tioles libres se modifican y que existe una selectividad en la unión de cyPG a proteínas. Así pues, la caracterización funcional y estructural de estas proteínas diana podría proporcionar valiosa información sobre el mecanismo de acción de estas cyPG, así como sobre los factores implicados en la selectividad de estas modificaciones.

3.2.3.2 Interacciones de las cyPG con factores de transcripción

La vía de NF- κ B (factor nuclear- κ B) se activa en respuesta a estímulos proinflamatorios y media la inducción transcripcional de genes como iNOS, COX-2, moléculas de adhesión y citoquinas. La proteína heterodimérica NF- κ B permanece inhibida formando un complejo en el citoplasma con las proteínas I κ B. Tras la activación de la vía de NF- κ B, las I κ B son fosforiladas por IKK (α y β) y rápidamente degradadas por el proteasoma. NF- κ B se trasloca al núcleo y se une a las secuencias consenso del ADN (Hayden y Ghosh, 2004). Algunas cyPG como 15d-PGJ₂ y PGA₁ pueden interaccionar con la activación de la vía de NF- κ B a varios niveles, incluyendo la inhibición del proteasoma (Shibata *et al.*, 2003b), la modificación de determinados residuos de cisteínas en IKK α y IKK β , (Castrillo *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000) y también la modificación de cisteínas presentes en los dominios de unión a ADN de las subunidades de este factor de transcripción (p50 y p65) (Cernuda-Morollon *et al.*, 2001; Straus *et al.*, 2000). Como resultado de esta interacción, las cyPG inhiben la actividad de IKK, previniendo la fosforilación y la degradación de la subunidad reguladora I κ B (Rossi *et al.*, 2000), bloqueando la traslocación o la acumulación nuclear del factor activo, además de poder bloquear directamente la unión de las proteínas de NF- κ B al ADN, inhibiendo la expresión génica derivada de NF- κ B.

La inhibición de la vía de NF- κ B producida por algunas cyPG como la PGA₁, está asociada con la inducción del factor de transcripción de choque térmico (HSF) (Rossi *et al.*, 1997). En células en reposo, los monómeros inactivos de HSF se localizan en el citoplasma formando un complejo con la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) y otras chaperonas moleculares. Situaciones de choque térmico o la aparición de proteínas celulares dañadas en el citoplasma, producen la disociación rápida del complejo HSF-Hsp70. Esta disociación permite la entrada al núcleo de los trímeros de HSF que se unen a los elementos de respuesta a choque térmico del DNA (Santoro, 2000). Algunas cyPG inducen una activación del HSF, aumentando la transcripción de genes de respuesta a choque térmico tal y como se ha observado en células eritroleucémicas humanas tras el tratamiento con PGA₁ (Amici *et al.*, 1992) o en células mesangiales humanas tratadas con 15d-PGJ₂ (Zhang *et al.*, 2004).

AP-1 (proteína activadora-1) es otro factor de transcripción sensible al estado redox, implicado en la regulación de una amplia variedad de funciones celulares. Existe como homo o heterodímero compuesto por miembros de las familias de Jun (c-Jun, JunB y Jun D) y Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2), formando un complejo Jun-Fos-ADN (Kim y Surh, 2006). Las cyPG interaccionan con las vías de señalización que controlan la

activación de AP-1 a distintos niveles, como es el caso de 15d-PGJ₂, que puede unirse al residuo de cisteína presente en el dominio de unión a ADN de c-Jun, y también modifica a c-Fos, inhibiendo la actividad de unión a ADN de AP-1 (Perez-Sala *et al.*, 2003).

Recientemente se ha establecido el papel de las cyPG en la estimulación de la respuesta antioxidante, mediante la modificación covalente de Keap1 y la consecuente activación del factor de transcripción Nrf2 (factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45) (Kansanen *et al.*, 2009). Nrf2 es un factor de transcripción que reconoce los elementos de respuesta antioxidante (ARE) en los promotores de los genes diana. En condiciones basales, está unido en el citoplasma a Keap1, que actúa como un adaptador para la interacción con una ubiquitina ligasa conduciendo a Nrf2 a la degradación por el proteasoma. Activadores endógenos como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, aldehídos lipídicos o 15d-PGJ₂, así como determinados agentes exógenos como metales pesados y agentes xenobióticos electrófilos, producen una alteración de la interacción de Nrf2 y Keap1, permitiendo la entrada de Nrf-2 al núcleo (Osburn y Kensler, 2008). Este factor estimula la transcripción de genes de las enzimas implicadas en la síntesis de GSH como la γ -glutamil-cisteína-sintasa (GCS), hemooxigenasa-1 (HO-1) y glutathione S-transferasas (GST) (Nguyen *et al.*, 2009). Se ha postulado que Nrf2 es un mediador de los efectos antiinflamatorios de 15d-PGJ₂ (Itoh *et al.*, 2004).

Los mecanismos que explican la actividad antiinflamatoria de diversas cyPG, como la 15d-PGJ₂, no sólo incluyen la inhibición de las vías de NF- κ B y AP-1, sino también la inhibición de la vía de STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción) (Ricote *et al.*, 1998). Las STAT son una familia de proteínas citoplasmáticas que regulan la transcripción de diversos genes tras ser activadas mediante fosforilación. Dicha activación se produce cuando determinados polipéptidos extracelulares, como las citoquinas o factores de crecimiento, interaccionan con receptores de membrana específicos (Darnell, 1997). Se ha descrito que la 15d-PGJ₂ inhibe la fosforilación de STAT mediada por interferón γ (IFN γ) (Chen *et al.*, 2003), así como la desencadenada por IL-6 e IL-10 en diversos tipos celulares (Ji *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005).

La función supresora de tumores de la proteína p53 está mediada por diversos mecanismos, como parada del ciclo celular, apoptosis y senescencia celular (Vogelstein *et al.*, 2000). Se ha descrito que la 15d-PGJ₂ induce la apoptosis en diversos tipos celulares a través de la activación o la acumulación nuclear de p53 (Dong *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 2002; Shan *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2003b). Sin embargo, en células tumorales de cáncer de mama se ha descrito que la 15d-PGJ₂ modifica el residuo de

cisteína en posición 277 de p53, y que esta modificación media un cambio conformacional en p53 que le hace menos susceptible a la degradación por el proteasoma. A pesar de esta acumulación celular de p53, la 15d-PGJ₂ induce una disminución en la actividad transcripcional, ya que anula la unión de p53 al DNA (Kim *et al.*, 2010). En modelos celulares de cáncer de colon, la PGA₁ y la PGA₂ inducen un cambio conformacional de p53, inactivando su función transcripcional y alterando su distribución subcelular (Moos *et al.*, 2000).

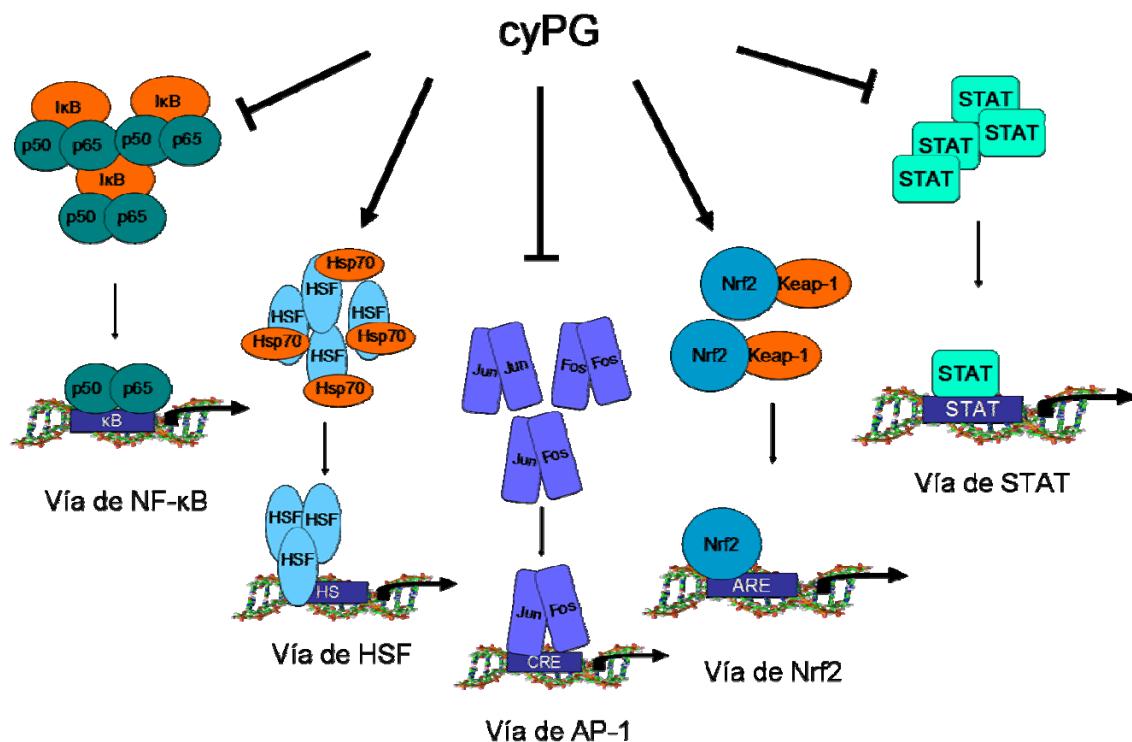


Figura 4. Interacción de las cyPG con algunas vías de transcripción.

Se ha demostrado que la 15d-PGJ₂ induce la expresión de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) en diversos tipos celulares como macrófagos, células del músculo liso vascular, células endoteliales y de cáncer de próstata (Kim y Surh, 2006). La región promotora de VEGF posee sitios de unión para los factores de transcripción AP-1, AP-2, Sp1 y HIF-1. En células endoteliales humanas, se ha descrito que en condiciones de normoxia, la 15d-PGJ₂ estimula la síntesis de VEGF producida por una inducción de la expresión de HO-1. Pero en condiciones de hipoxia, la 15d-PGJ₂ reduce la liberación de VEGF ya que esta cyPG inhibe la actividad de HIF-1, que es el mayor regulador de VEGF en condiciones de hipoxia (Jozkowicz *et al.*, 2004).

Además de la modificación directa por las cyPGs, algunas proteínas sensibles al estado redox y en particular, factores de transcripción, pueden estar reguladas por las cyPG a través de mecanismos indirectos. Los ciclos de oxidación-reducción son claves para la regulación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, p53 y Nrf2. La tiorredoxina y la tiorredoxina reductasa (Trx y TR) juegan un papel fundamental en la reducción de factores de transcripción. Además de inducir estrés oxidativo en las células, las cyPG pueden modificar directamente e inhibir tanto a la Trx como a la TR (Moos *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2003a). En la inflamación, donde se produce estrés oxidativo y la generación de diversas cyPG, las posibilidades de regulación de factores de transcripción son múltiples, y pueden abrir nuevas perspectivas para futuros abordajes terapéuticos (Diez-Dacal y Perez-Sala, 2010).

3.3 ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES POR LAS cyPG MEDIANTE ABORDAJES PROTEÓMICOS

En los últimos años se han hecho muchos avances en el estudio de las dianas celulares de las cyPG, y el desarrollo de las técnicas proteómicas y de espectrometría de masas ha contribuido a la identificación de nuevas dianas y a describir los mecanismos de acción de estos compuestos electrófilos.

Uno de los primeros trabajos que estudió las modificaciones covalentes de derivados de las prostaglandinas mediante estos abordajes fue desarrollado por Atsmon. Se describió la formación del aducto de glutatión con 9-desoxi- Δ^9, Δ^{12} (E)-prostaglandina D₂ mediante el empleo de espectrometría de masas de bombardeo atómico rápido, y la identificación posterior del sitio de la monoconjugación en el C9 del glutatión mediante análisis de ¹H-RMN (Atsmon *et al.*, 1990).

Más tarde se empezaron a emplear análogos biotinilados de las cyPG para explorar por SDS-PAGE la unión de estos compuestos a proteínas celulares, como se llevó a cabo con el derivado biotinilado de PGA₂ (Parker, 1995). Estos compuestos biotinilados poseen el grupo de biotina acoplado al grupo carboxilo de las cyPG mediante un espaciador, lo que en principio no afecta a su reactividad ni a su interacción con numerosas proteínas celulares. Es importante destacar que resultados de nuestro laboratorio han demostrado que los análogos biotinilados mimetizan muchos de los diversos efectos biológicos descritos para las cyPG (Garzon *et al.*, 2010; Stamatakis *et al.*, 2006). Además, la modificación de proteínas por los derivados biotinilados resulta aparentemente estable,

por lo que estos compuestos se han convertido en herramientas útiles para la identificación de las dianas biológicas de las cyPG (Figura 5).

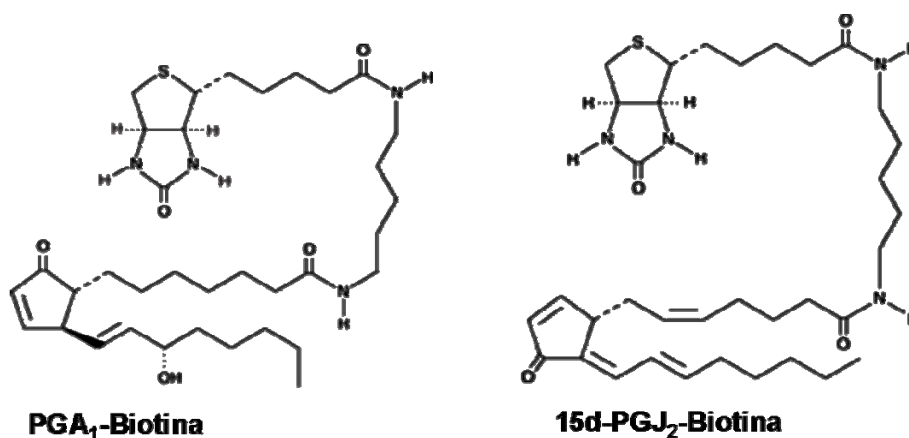


Figura 5. Estructura de los análogos biotinilados de las prostaglandinas ciclopentenonas PGA₁ y 15d-PGJ₂.

Varios grupos han descrito el uso de los derivados biotinilados de 15d-PGJ₂ y PGA₁ (15d-PGJ₂-B y PGA₁-B) en combinación con técnicas proteómicas (Aldini *et al.*, 2007; Charles *et al.*, 2011; Garzon *et al.*, 2010; Gharbi *et al.*, 2007; Hilliard *et al.*, 2010; Landar *et al.*, 2006; Stamatakis *et al.*, 2006). Esto ha permitido la identificación de numerosas proteínas diana para la modificación por estas cyPG.

Un resumen de los trabajos más relevantes en la identificación de dianas biológicas de cyPG mediante abordajes proteómicos se presenta en la tabla 1. La mayor parte de los estudios realizados se ha centrado en el estudio de las dianas de 15d-PGJ₂, aunque recientemente han cobrado importancia otras cyPG, como la PGA₁, PGA₂ y Δ^{12} -PGJ₂. Los métodos empleados han sido principalmente análisis por MALDI-TOF MS o LC-ESI MS/MS, este último utilizado principalmente en la identificación de los residuos modificados de las proteínas diana.

cyPG	AUTOR	MÉTODO PROTEÓMICO	DIANAS IDENTIFICADAS	RESIDUO MODIFICADO
ABORDAJES DIRIGIDOS				
15d-PGJ ₂	Shibata 2003	MALDI-TOF MS y ESI- LC/MS/MS	Tiorredoxina	Cys35, Cys69
15d-PGJ ₂	Kim 2007	Nanoflow RPLC MS/MS	Receptor de estrógenos α	Cys227, Cys240
15d-PGJ ₂	Vunta 2007	MALDI-TOF MS	IKKβ	Cys179
15d-PGJ ₂	Kobayashi 2009	MALDI-TOF MS	Keap1	Cys273, Cys288
15d-PGJ ₂	Cocca 2009	Nano-HPLC tandem triple-quadrupole MS	Tubulina (α y β)	Cys241, Cys305, Cys316, Cys 356
15d-PGJ ₂	Liu 2010	LC- ESI-TOF MS	Hidrolasa carboxi-terminal de ubiquitina L1	
PGA ₂	Renedo 2007	MALDI-TOF MS	H-Ras	Cys118, Cys181, Cys184
PGA ₂	Kobayashi 2009	MALDI-TOF MS	Keap1	Cys273, Cys297, Cys489
Δ ¹² -PGJ ₂	Renedo 2007	MALDI-TOF-TOF MS/MS	H-Ras	Cys118, Cys181, Cys184
Δ ¹² -PGJ ₂	Yamaguchi 2010	Nano-LC-MS/MS	Albúmina sérica humana	His146
ABORDAJES AMPLIOS				
15d-PGJ ₂	Stamatakis 2006	MALDI-TOF MS	Hsp90	
			Vimentina	
			Tubulina	
			Actina	
15d-PGJ ₂	Landar 2006	MALDI-TOF MS	Carboxilasas y deshidrogenasas mitocondriales	
15d-PGJ ₂	Charles 2011	LC-MS/MS	Epóxido hidrolasa	
			Miosina 11	
			Hsp71, Hsp70, Hsp60	
			Carboxilasas y deshidrogenasas mitocondriales	
			Xantina deshidrogenasa	
PGA ₁	Garzón 2010	Nano-HPLC-ESI MS/MS	Lactato deshidrogenasa	
			Glucosa-6-fosfato isomerasa	
			Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	
			Actina	
			Tubulina	
			Fascina	
			α- actinina	
			Factor de elongación 1α y 2	
ABORDAJES MIXTOS				
15d-PGJ ₂	Aldini 2007	MALDI-TOF MS	β-Actina	
			Enzimas glicolíticas (enolasa, lactato deshidrogenasa)	
			Enzimas redox (biliverdina reductasa)	
			Proteína reguladora eucariótica (14-3-3γ)	
15d-PGJ ₂	Hilliard 2010	LC- ESI-MS/MS	G-Actina	Cys374
		LC-ESI MS/MS	Exportina CRM-1	Cys528
PGA ₁	Gharbi 2007	Nano-HPLC-ESI MS/MS	Hsp90	
			Vimentina	
			Proteína ácida fibrilar glial	
			Actina	
			Tubulina	
			Factor de iniciación eucariótico 4A-I	
			Factor de elongación-1α1	
		MALDI-TOF MS	Vimentina	Cys328

Tabla 1. Estudios proteómicos realizados para la identificación y caracterización de dianas para la modificación de cyPG. Los abordajes dirigidos engloban los estudios encaminados a la identificación de una proteína en concreto mediante el empleo de proteínas recombinantes, así como de la caracterización de los residuos de modificación. Los estudios clasificados como abordajes amplios identifican diversas proteínas diana para la modificación de cyPG partiendo de muestras celulares. Los estudios que combinan ambos abordajes son clasificados como mixtos.

Estos trabajos se pueden clasificar en función del abordaje planteado en el estudio de la modificación de las proteínas. Algunos se centran en la identificación o confirmación del sitio de modificación de una proteína específica, mediante técnicas *in vitro* utilizando la proteína recombinante o péptidos purificados, como es el caso de los estudios llevados a cabo sobre la tioredoxina, tubulina o Keap1 (Cocca *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007a; Kobayashi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Renedo *et al.*, 2007; Shibata *et al.*, 2003a; Vunta *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2010). Otros estudios emplean abordajes amplios encaminados a la identificación de dianas proteicas partiendo de lisados celulares o fracciones celulares separadas previamente por electroforesis bidimensional o cromatografía líquida (LC) (Charles *et al.*, 2011; Garzon *et al.*, 2010; Landar *et al.*, 2006; Stamatakis *et al.*, 2006). Algunos trabajos utilizan ambos tipos de abordajes, llevando a cabo la identificación de dianas potenciales de cyPG y la caracterización estructural y funcional del residuo de modificación de algunas de las proteínas identificadas (Aldini *et al.*, 2007; Gharbi *et al.*, 2007; Hilliard *et al.*, 2010).

3.4 ACCIONES BIOLÓGICAS DE LAS cyPG

3.4.1 Efectos antiproliferativos

Uno de los primeros efectos que fueron descritos para las cyPG fue su actividad antiproliferativa, que condujo a que se consideraran como potenciales agentes antineoplásicos. El descubrimiento de que la PGJ₂ y sus derivados poseían mayor actividad antitumoral que su precursor PGD₂, y que esta actividad no estaba mediada por su unión a receptores acoplados a proteínas G, supuso un gran avance (Kikawa *et al.*, 1984; Narumiya y Toda, 1985). Este precedente impulsó la síntesis de derivados de las cyPG de las series A y J, cuya capacidad para inhibir el crecimiento de diversas células tumorales, dio lugar a la dilucidación de la relación estructura-actividad de estos compuestos. Estos estudios indicaron que las dienonas son más activas que las enonas, que los dos estereoisómeros en el C12 de las cyPG de la serie A son igual de activos, y que el grupo hidroxilo en el C15 era prescindible para su actividad (Sugiura *et al.*, 1984; Kato *et al.*, 1986).

En algunas líneas celulares tumorales, las cyPG causan parada del ciclo celular en la fase G₁, relacionada con la inducción de p21^{CIP1/WAF1} y con la disminución de la expresión de diversas proteínas que inducen la progresión del ciclo celular, como el factor de crecimiento IGF-I o la ciclina D1 (Bui *et al.*, 1997; Gorospe *et al.*, 1996). Sin embargo, en otras células tumorales, las cyPG causan muerte celular debida a apoptosis

(Bishop-Bailey y Hla, 1999; Ikai *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1996), o asociada a parada del ciclo celular en fase S.

El tratamiento con las cyPG puede desencadenar la apoptosis celular mediante la inducción de estrés oxidativo tanto mitocondrial como derivado de la NADPH oxidasa (Shin *et al.*, 2009). Las cyPG pueden inducir apoptosis mediante la modulación de factores de transcripción, como la inhibición de la actividad de NF- κ B (Piva *et al.*, 2005) o la activación o acumulación nuclear de p53 en determinados modelos celulares (Dong *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 2002; Shan *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2003b). Además, la desorganización del citoesqueleto (Aldini *et al.*, 2007; Gayarre *et al.*, 2006; Stamatakis *et al.*, 2006), la inhibición de la síntesis de proteínas (Kim *et al.*, 2007b) o la regulación de la transcriptasa reversa de la telomerasa pueden jugar un papel importante en la actividad antiproliferativa de estos compuestos (Aldini *et al.*, 2007; Moriai *et al.*, 2009).

3.4.2 Efectos antivirales

Las cyPG, especialmente PGA₁ y sus derivados, interfieren en la replicación vírica a muchos niveles y desencadenan la síntesis de proteínas citoprotectoras en la célula huésped. Inhiben la replicación de una gran variedad de virus ARN y ADN en diferentes tipos de células de mamífero. También se ha podido probar la actividad de derivados de cyPG *in vivo* en ratones infectados con el virus de la gripe A y del herpes (Santoro *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 1986). La actividad antiviral se detecta a concentraciones micromolares, que no inhiben la síntesis de proteínas celulares (Santoro, 1994). Los mecanismos implicados en la actividad antiviral de las cyPG están relacionados con la inhibición de la glicosilación de las proteínas víricas así como con la inducción de los niveles de expresión de Hsp70, que inhibe la síntesis de proteínas virales durante la fase inicial de la infección. Las cyPG también interfieren en la transcripción del ARN viral, mediante la inhibición de la vía de NF- κ B (Santoro, 1997).

3.4.3 Efectos antiinflamatorios

Desde que se descubriera que las cyPG desencadenaban la inhibición del factor de transcripción NF- κ B, implicado en la inducción de numerosos genes proinflamatorios, se ha investigado en profundidad la actividad de las cyPG en modelos celulares y animales de inflamación. Se ha demostrado que la 15d-PGJ₂ inhibe la producción de citoquinas inflamatorias de monocitos (Jiang *et al.*, 1998), reduce la expresión de iNOS en diversos tipos celulares (Heneka *et al.*, 1999; Petrova *et al.*, 1999), inhibe la inducción mediada por citoquinas de COX-2 y de ICAM-1, así como la expresión y actividad de

metaloproteinasas de matriz (MMP) (Marx *et al.*, 1998). En modelos animales, las cyPG atenúan el desarrollo de la inflamación aguda y crónica (Cuzzocrea *et al.*, 2002), reducen la inflamación sistémica en sepsis microbiana (Zingarelli *et al.*, 2003) y reducen el edema (Iannaro *et al.*, 2003).

Las acciones antiinflamatorias observadas *in vitro* e *in vivo* de la 15d-PGJ₂ son debidas a la inhibición de los factores de transcripción NF-κB y AP-1 y también se han relacionado en algunos sistemas con la activación de la respuesta antioxidante e inducción de HO-1 (Lee *et al.*, 2003). La activación de PPARγ media algunos de los efectos observados *in vivo*, debido en parte a la capacidad de PPARγ para interferir con NF-κB y AP-1 (Ponferrada *et al.*, 2007). Se ha sugerido también que los efectos antiinflamatorios de la 15d-PGJ₂ pueden estar asociados a estrés oxidativo (Itoh *et al.*, 2004). Se ha encontrado una correlación entre la acumulación de 15d-PGJ₂ endógena en modelos de inflamación y la activación de Nrf2 y se ha propuesto que Nrf2 puede regular la respuesta inflamatoria aguda dirigiendo el reclutamiento de células inflamatorias y la expresión de los genes de respuesta a estrés oxidativo desencadenada por el tratamiento con 15d-PGJ₂ (Itoh *et al.*, 2004).

3.5 RELEVANCIA DE LAS PROSTAGLANDINAS EN TERAPÉUTICA

Las PG son moléculas con acciones biológicas diversas y algunos compuestos derivados de las PG son administrados como fármacos en el tratamiento de diversas patologías. Por otra parte, la ruta de biosíntesis de las PG, es diana para los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

Los fármacos AINES como el ácido acetil salicílico, indometacina o ibuprofeno, bloquean la síntesis de PG mediante la inhibición de las COX, aunque también se ha descrito que algunos fármacos de esta familia afectan a factores de transcripción como NF-κB y la familia de los PPAR. Los COXIB (celecoxib, rofecoxib) emergieron como la alternativa a los AINES ya que inhibían selectivamente a la COX-2, evitando los efectos adversos sobre la mucosa gastrointestinal. Estaban indicados en el tratamiento de la artritis, pero un aumento en la incidencia de trastornos cardiovasculares hizo que se descartaran en terapéutica (Funk, 2001; Cerella *et al.*, 2010).

Las PG se sintetizan en grandes cantidades en la mucosa gástrica e intestinal, y se ha descrito que la PGE₂ y la PGI₂ inhiben la secreción ácida del estómago. El misoprostol es

un análogo de la PGE_1 que es administrado para prevenir la lesión gástrica producida por la administración crónica de AINES. En el endometrio y el miometrio se sintetizan también PG de la serie E y F, que producen contracciones en el útero gestante y no gestante. Las PG utilizadas en obstetricia son dinoprostona (PGE_2), carboprost (15-metil- $PGF_{2\alpha}$) y gemeprost (análogo de PGE_1) (Rang *et al.*, 2000).

La actividad antiviral de algunas PG de la serie E se ha demostrado en diversos estudios realizados con pacientes. La administración de la PGE_1 o la PGE_2 es efectiva en el tratamiento de la hepatitis viral fulminante (Sinclair *et al.*, 1989). Los efectos citoprotectores de las PG han sido utilizados en la prevención de la reactivación de la hepatitis B tras trasplante de hígado. En pacientes de hepatitis B crónica, el tratamiento con PGE_2 condujo a un descenso en la replicación vírica (Hyman *et al.*, 1999).

Debido a la actividad antiproliferativa de las cyPG, se las ha considerado como fármacos potenciales en la terapia contra el cáncer, y algunas cyPG o compuestos relacionados han sido evaluados en ensayos preclínicos. Se ha descrito que existe una interacción sinérgica citotóxica entre PG como la PGD_2 , Δ^{12} - PGJ_2 o Δ^{12} - PGA_1 y el cisplatino en células tumorales humanas de ovario (Kikuchi *et al.*, 1992), así como entre Δ^{12} - PGJ_2 y las radiaciones ionizantes en diversas líneas celulares tumorales (McClay *et al.*, 1996).

La adquisición de la resistencia a fármacos por las células cancerosas es uno de los mayores problemas en la terapia del cáncer. Se ha descrito que Δ^{12} - PGJ_2 y Δ^7 - PGA_1 poseen actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales de ovario resistentes al tratamiento con cisplatino y adriamicina entre otros fármacos. También se ha demostrado que el tratamiento con el compuesto 13,14-dihidro-15-desoxi- Δ^7 - PGA_1 metil éster es efectivo tanto en líneas celulares tumorales de ovario resistentes al tratamiento con cisplatino en estudios *in vitro* (Sasaki y Fukushima, 1994) como administrado en microesferas lipídicas en ensayos *in vivo* en modelos de ratón (Sasaki *et al.*, 1999). En estudios más recientes, la 15d- PGJ_2 ha mostrado una marcada actividad antitumoral en líneas celulares de cáncer de mama resistentes a la quimioterapia, debido a su potente efecto inhibidor de la vía de NF- κ B. Se ha determinado que la estructura de ciclopentenona es responsable de estos efectos (Ciucci *et al.*, 2006).

Estos resultados sugieren que las cyPG no se ven afectadas por algunos mecanismos de resistencia que se dan frente a otros fármacos. La enzima glutathione transferasa P1-1 (GSTP1-1) interviene en esta quimiorresistencia, y recientemente se ha demostrado que esta enzima es diana para la modificación por la 15d- PGJ_2 , que da lugar a su inactivación

mediante una oligomerización irreversible. Este mecanismo podría conducir a nuevas estrategias en la terapia frente a la resistencia a fármacos antitumorales (Sanchez-Gomez *et al.*, 2010).

Las diversas actividades biológicas descritas para las cyPG sugieren la aplicación terapéutica potencial de estos compuestos en numerosas patologías, pero también cabe destacar que son la causa de los efectos adversos derivados del tratamiento con cyPG. La identificación de las dianas celulares de estos compuestos puede proporcionar valiosa información para entender y poder predecir dichos efectos adversos.

4. CITOESQUELETO: LAS PROTEÍNAS DE FILAMENTOS INTERMEDIOS

La capacidad de las células eucariotas de resistir a la deformación, de llevar a cabo el transporte intracelular y cambiar de forma durante el movimiento depende del citoesqueleto, compuesto de un entramado de polímeros filamentosos y proteínas reguladoras. Las funciones del citoesqueleto pueden resumirse en tres: organiza espacialmente el contenido celular, conecta físicamente y bioquímicamente a la célula con el ambiente exterior, y genera fuerzas coordinadas que permiten a la célula moverse y cambiar de forma. El citoesqueleto es una estructura dinámica y adaptativa cuyos componentes están en constante flujo (Fletcher y Mullins, 2010).

Existen tres tipos de polímeros que constituyen el citoesqueleto: los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Las estructuras y las funciones de las redes que forman se diferencian en la rigidez mecánica, la dinámica del ensamblaje, la polaridad y el tipo de moléculas con las que se asocian.

Los microtúbulos son los polímeros más rígidos y poseen una dinámica de ensamblaje y desensamblaje muy compleja. Están compuestos por láminas de protofilamentos formados por heterodímeros de α y β tubulina que constituyen cilindros polarizados de 24 nm de diámetro dispuestos en torno a centros de organización. La regulación de la dinámica de los microtúbulos es esencial para la mitosis, migración celular, señalización celular y tráfico de vesículas. Existen fármacos que interfieren en la dinámica de microtúbulos que poseen actividad antimitótica y antiangiogénica y se emplean en la terapia antitumoral (Honore *et al.*, 2005).

En condiciones fisiológicas, la actina se encuentra en forma de polímero helicoidal alargado (actina F) formado por la unión de monómeros globulares (actina G). Los filamentos de actina son menos rígidos que los microtúbulos, poseen un diámetro de 7 a 9 nm, y están compuestos de homopolímeros de actina. Los isotipos de esta proteína (α , β y γ) presentan una alta homología de secuencia pero distintas características biológicas y su expresión depende del tipo celular. A diferencia de los microtúbulos, los filamentos de actina no siguen ciclos de polimerización y despolimerización, sino una continua elongación en presencia de los monómeros, que se ensamblan o disocian en respuesta a la actividad de sistemas de señalización. Esta red de filamentos interviene en la quimiotaxis y comunicación intercelular, ya que son responsables de los movimientos celulares mediante filipodia, lamelipodia y migración. Determinan la polarización de la mayor parte de células móviles y generan los movimientos que conllevan los cambios en la forma celular, como los que ocurren durante la fagocitosis (Fletcher y Mullins, 2010).

La superfamilia de los filamentos intermedios (IF) engloba a un gran número de proteínas (65 genes en humanos) que se ensamblan en filamentos de 8 a 12 nm de diámetro y son los elementos estructurales principales del núcleo y citoplasma en las células de mamífero. Se caracterizan por ser filamentos flexibles y resistentes que pueden ser ensamblados en respuesta a estrés mecánico. Las proteínas que componen esta familia comparten la estructura primaria dividida en tres dominios, un dominio central muy conservado de α -hélice, una cabeza N-terminal variable y un dominio de cola C-terminal (Herrmann y Aebi, 2004; Strelkov *et al.*, 2003).

Aunque estas proteínas son específicas del tipo celular y muy divergentes en su secuencia, se pueden clasificar en seis categorías en función de la estructura génica, la homología de secuencia, y sus propiedades inmunológicas y de ensamblaje. Todas forman filamentos intermedios citoplasmáticos excepto las laminas (IF de tipo V) que componen la envuelta nuclear. Las queratinas (tipo I y II) se expresan en células epiteliales, los IF de tipo III engloban por ejemplo a la vimentina, expresada en células de origen mesenquimal, la desmina en células musculares, y GFAP (proteína ácida fibrilar glial) en células de la glia. Las proteínas de tipo IV se encuentran en neuronas e incluyen a las proteínas de los neurofilamentos y la α -internexina. El tipo VI engloba a proteínas como la nestina, sinemina, paranemina y tanabina (Paramio y Jorcano, 2002).

La principal función de los filamentos intermedios es la de conferir resistencia mecánica a las células, aunque se han descrito otras funciones como la modulación de determinadas rutas de señalización (Paramio y Jorcano, 2002). Muchas enfermedades están asociadas

a mutaciones en genes que codifican proteínas de IF y estas alteraciones no están relacionadas con funciones estructurales, lo que indica que las proteínas de los IF están implicadas en otras funciones celulares, como la organización de la arquitectura del citoplasma, la migración y división celular, así como la señalización y/o regulación de la transcripción (Eriksson *et al.*, 2009). En los últimos años se ha descubierto que los IF son importantes para el transporte y funcionamiento de las organelas de membrana (Styers *et al.*, 2005), la localización del núcleo celular, así como en el mantenimiento de la composición lipídica de la membrana (Minin y Moldaver, 2008).

4.1 LA VIMENTINA

La vimentina es la proteína mayoritaria en las células mesenquimales, como los fibroblastos y células endoteliales. Es utilizada frecuentemente como marcador del desarrollo de células y tejidos. Por su expresión en células poco diferenciadas se usa en clínica como marcador de origen y malignidad de tumores. La inducción de la expresión de vimentina es una de las características típicas de la transición epitelio-mesenquimal, que ocurre durante la malignización de un tumor de origen epitelial. El principal mecanismo responsable de la progresión del cáncer de mama es debido a que las células tumorales pierden sus características epiteliales y ganan propiedades mesenquimales, cambiando el perfil de filamentos intermedios: de un patrón rico en queratinas a uno mayoritariamente compuesto de vimentina (Kokkinos *et al.*, 2007). En modelos de carcinoma de mama, la sobreexpresión de vimentina conlleva un aumento en la motilidad y la invasividad *in vitro* (Hendrix *et al.*, 1996).

Esta proteína de IF presenta una alta homología de secuencia entre especies (Herrmann *et al.*, 1989; Schaffeld *et al.*, 2001), lo que demuestra su implicación en funciones importantes y conservadas evolutivamente. La vimentina confiere a las células resistencia mecánica y funciona como adaptador perinuclear de la fosfolipasa A2 (Murakami *et al.*, 2000; Toivola *et al.*, 2005). La ausencia o la alteración de la estructura de los filamentos de vimentina disminuye la estabilidad de los triglicéridos en preadipocitos y produce cambios en el metabolismo del colesterol en fibroblastos y células adrenales (Schweitzer y Evans, 1998). El estudio del fenotipo de ratones deficientes en vimentina ha revelado la participación de la vimentina en diversas funciones celulares relacionadas con la organización y regulación de proteínas involucradas en la adhesión, migración y señalización celular (Eriksson *et al.*, 2009).

Los fibroblastos deficientes en vimentina presentan una movilidad y migración reducidas que pueden afectar a la cicatrización de heridas (Eckes *et al.*, 2000; Eckes *et al.*, 1998). La vimentina también interviene en la transducción mecánica de la fuerza de cizallamiento en el tejido arterial (Henrion *et al.*, 1997). Además, la transmigración y extravasación de linfocitos así como la integridad del endotelio vascular se ven afectados por la ausencia de vimentina (Nieminen *et al.*, 2006). La vimentina y la desmina son proteínas mayoritarias en el músculo liso, y la deficiencia de ambas reduce la contractilidad en diversas preparaciones de músculo liso, indicando su importancia en el mantenimiento del tono en el músculo liso (Tang, 2008). La deficiencia en vimentina también afecta a la capacidad contráctil de los fibroblastos (Eckes *et al.*, 1998), sugiriendo un papel esencial en las propiedades mecánicas en células no musculares.

4.2 LAS LAMINAS

Las laminas son el componente principal de la envoltura nuclear. Poseen características que las diferencian del resto de proteínas de los filamentos intermedios, ya que poseen en el dominio central de su estructura 42 aminoácidos que no existen en otros tipos de proteínas de IF. Además, el dominio C-terminal alberga una señal de localización nuclear, y una caja CaaX que es diana para isoprenilación y carboximetilación, presente en todas las proteínas de mamífero de esta familia excepto en la lamina C (Holtz *et al.*, 1989; Krohne *et al.*, 1989). Estas secuencias aseguran que las laminas puedan entrar en el núcleo y se localicen en la membrana nuclear interna.

Se clasifican en dos subfamilias, las laminas tipo A, que se expresan en la mayoría de células diferenciadas, y las laminas tipo B que se expresan en la mayor parte de células somáticas. Las laminas tipo A son productos derivados por procesamiento alternativo del mismo gen *LMNA* e incluyen las mayoritarias laminas A y C, y las laminas AΔ10 y C2. Aunque desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la estabilidad nuclear, intervienen también en la regulación de factores de transcripción. Las laminas tipo B (B1, B2 y B3) son esenciales para la viabilidad celular. Proceden de dos genes, *LMNB1* y *LMNB2* y son consideradas los bloques esenciales de la envuelta nuclear porque al menos una lamina de tipo B debe expresarse en la célula para que ésta sea viable. Las laminas determinan el tamaño, la morfología y la resistencia de la envuelta nuclear, en parte debido a que interaccionan con otros componentes del citoesqueleto (Broers *et al.*, 2006).

Diversos estudios han demostrado el papel de las laminas en la replicación, transcripción y reparación de ADN, en los procesos de señalización, proliferación y diferenciación celular así como en la organización estructural, funcional y epigenética de la cromatina (Dechat *et al.*, 2008). Las laminas de tipo A y sus proteínas asociadas interaccionan con diversos componentes de rutas de señalización, como las MAPK (Gonzalez *et al.*, 2008; Muchir *et al.*, 2007a; Muchir *et al.*, 2007b; Muchir *et al.*, 2009), Wnt- β -catenina (Markiewicz *et al.*, 2006), TGF- β (Van Berlo *et al.*, 2005) y Notch (Pereira *et al.*, 2008). La envuelta nuclear regula la expresión génica a través de interacciones directas de las laminas tipo A con factores de transcripción. Las laminas tipo A interaccionan por ejemplo, con la proteína de retinoblastoma (pRb), cFos, la proteína de unión a elementos regulados por esteroides 1 (SREBP1) o MOK2 ("zinc finger protein 239") (Andres y Gonzalez, 2009). Estas laminas tipo A también regulan la expresión génica a través de interacciones directas con el ADN o indirectas mediante la interacción con histonas, BAF y proteínas de dominio LEM (Dechat *et al.*, 2009; Vlcek y Foisner, 2007).

Las laminas nucleares cobraron especial interés desde el descubrimiento de que mutaciones en el gen *LMNA* causan un grupo de enfermedades denominadas laminopatías. Estos desórdenes incluyen la cardiomiopatía dilatada con distrofia muscular variable, la lipodistrofia parcial familiar de tipo Dunnigan, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2, la displasia madibuloacral y la progeria de Hutchinson-Gilford. Existen otras enfermedades órgano-selectivas causadas por mutaciones en los genes que codifican las laminas tipo B y proteínas relacionadas. El estudio de estas enfermedades está proporcionando valiosa información sobre las funciones de la envuelta nuclear así como sobre el proceso de envejecimiento (Worman *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

Las prostaglandinas ciclopentenonas (cyPG) son mediadores endógenos implicados en numerosos procesos celulares relacionados con la resolución de la inflamación o con la proliferación celular, así como en efectos citoprotectores frente al estrés oxidativo y la infección viral. Parte de estos efectos son debidos a la reactividad electrófila característica de estos compuestos, que permite a las cyPG modificar covalentemente proteínas celulares. En la identificación de las dianas de cyPG se han utilizado ampliamente sus derivados biotinilados, como la 15d-PGJ₂-B y la PGA₁-B. Sin embargo, muchos de los aspectos relacionados con los efectos biológicos y la reactividad de estos compuestos biotinilados no han sido estudiados. Para que las dianas identificadas mediante el uso de los análogos biotinilados proporcionen información relevante sobre los mecanismos de acción de las cyPG, estos compuestos deben reproducir los efectos biológicos de las PG originales. Por ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.** Caracterizar a la PGA₁-B como herramienta válida para el estudio de las dianas biológicas de la PGA₁:
 - 1.1** Estudio de la estabilidad de la modificación de proteínas por las prostaglandinas biotiniladas en un modelo celular.
 - 1.2** Caracterizar la unión de las cyPG y sus derivados biotinilados a receptores nucleares como PPAR γ .
 - 1.3** Evaluar la capacidad de PGA₁-B para reproducir algunos efectos biológicos de la PGA₁.
- 2.** Estudio de las dianas celulares de las cyPG mediante el empleo de los análogos biotinilados de 15d-PGJ₂ y PGA₁.
 - 2.1** Confirmación de las dianas de PGA₁-B en fibroblastos murinos identificadas previamente.
 - 2.2** Caracterización de la modificación de vimentina por PGA₁-B.
 - 2.3** Estudio de la modificación de las laminas tipo A por cyPG biotiniladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

1.1 MEDIOS Y REACTIVOS PARA CULTIVOS

El medio de cultivo DMEM y el medio Opti-MEM utilizado en las transfecciones, la penicilina, la estreptomycin, la tripsina-EDTA y la glutamina fueron suministradas por Invitrogen. El suero de ternera fetal (FBS) procedió de CAMBREX/ Lonza. El material plástico fue adquirido de Falcon (Becton Dickinson). Las placas de 35 mm de diámetro utilizadas en experimentos de microscopía confocal fueron suministradas por Mat Tek Corporation.

1.2 LÍPIDOS ELECTRÓFILOS

La prostaglandina A₁, (PGA₁, ácido (13E, 15S) 15-hidroxi-9-oxo-prosta-10,13-dien-1-oico) y su análogo biotinilado (PGA₁-B, N-9-oxo-15S-hidroxi-prosta-10,13E-1-dien-1-oil-N-biotinoil-1,6-diaminohexano) procedieron de Cayman Chemical. La prostaglandina 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂, ácido 11-oxo-prosta-5Z,9,12E-tetraen-1-oico) fue suministrada por Calbiochem y Cayman Chemical, y su análogo biotinilado (15d-PGJ₂-B, N-11-oxo-prosta-5Z,9,12E,14E-tetraen-1-oil-N'-biotinoil-1,5-diaminopentano) procedió de Cayman Chemical.

1.3 LIGANDOS DE PPAR γ

El ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico (ANS), se obtuvo de Fluka Chemie, la rosiglitazona procedió de Alexis Biochemicals y la 9,10-dihidro-15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (CAY10410) fue proporcionada por Cayman Chemical.

1.4 ANTICUERPOS

1.4.1 Anticuerpos empleados en Western Blot e inmunoprecipitación

Los anticuerpos primarios anti-vimentina y anti-actina procedieron de Sigma. El anticuerpo anti-factor de elongación 1 α (anti-EF-1 α) fue proporcionado por Upstate. Los anticuerpos anti-factor de elongación 2 (anti-EF-2), anti-subunidad ligera de la γ -glutamyl-

cisteína sintetasa (anti- γ -GCSm), anti- α -actinina, anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (anti-GAPDH), anti-lamina A/C, anti-lamina B, anti-Sp1, anti-proteína quinasa 2 regulada por señales extracelulares (anti-ERK-2), anti-Rho GDI y anti-ubiquitina fueron suministrados por Santa Cruz. El anticuerpo monoclonal anti-tubulina y el anticuerpo anti-hemooxigenasa 1 (anti-HO-1) fueron proporcionados generosamente por la Dra. Isabel Barasoín y por el Dr. Ángel Corbí respectivamente (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC). El anticuerpo frente al receptor activado por inductores de la proliferación peroxisomal (anti-PPAR γ) fue obtenido de Millipore. El anticuerpo frente a la proteína de choque térmico 90 α (anti-Hsp90 α) fue suministrado por Stressgen. El anticuerpo anti-proteína fluorescente verde (anti-GFP) procedió de Roche y el anticuerpo anti-ácido liso-bis-fosfatídico (anti-LBPA) de Echelon. El anticuerpo antilactato deshidrogenasa acoplado a peroxidasa procedió de Abcam (HRP-LDH).

Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa frente a inmunoglobulinas de ratón y de conejo fueron obtenidos de Dako Cytomation, mientras que el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa frente a inmunoglobulinas de cabra fue de BioRad. La estreptavidina acoplada a peroxidasa (HRP-estreptavidina) y el sustrato quimioluminiscente (ECL) procedieron de Amersham (GE Biosciences).

1.4.2 Reactivos empleados en inmunofluorescencia

En los ensayos de inmunofluorescencia realizados en las células SW13 cl.2, el anticuerpo anti-vimentina procedió de Sigma. El anticuerpo secundario frente a inmunoglobulinas de ratón acoplado a Alexa Flúor 488 (A488) así como el 4',6- diamidino-2-fenilindol dicloridrato (DAPI) fueron suministrados por Molecular Probes (Invitrogen).

En los ensayos realizados en células U2OS y MEFs, la estreptavidina acoplada a Alexa Flúor 594 (A594) y a Alexa Flúor 633 (A633) fueron suministradas por Molecular Probes y la estreptavidina acoplada a FITC (isotiocianato de fluoresceína) procedió de Vector. Los anticuerpos anti-lamina A/C de ratón, anti-lamina A de conejo y anti-lamina B de cabra fueron obtenidos de Santa Cruz. El anticuerpo secundario frente a inmunoglobulinas de ratón acoplado a A633 fue adquirido de Molecular Probes, y los anticuerpos secundarios frente a inmunoglobulinas de conejo y de cabra acoplados a FITC de Santa Cruz.

1.5 PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La vimentina recombinante de hamster, así como la α -actinina purificada de músculo esquelético de conejo, fueron suministradas por Cytoskeleton Inc. La GAPDH y la actina purificada de músculo esquelético de conejo procedieron de Sigma. La Hsp90 α recombinante humana se adquirió de Stressgen. El dominio de unión a ligandos de PPAR γ (LBD-PPAR γ) fue expresado y purificado en el laboratorio de la Dra. Silvia Zorrilla, (Instituto Química-Física Rocasolano, CSIC) siguiendo un protocolo ya descrito anteriormente (Zorrilla *et al.*, 2010).

1.6 PLÁSMIDOS

La obtención de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos a pequeña escala se realizó con el “High Pure Plasmid Isolation Kit” de Roche. La obtención a gran escala de ADN plasmídico libre de endotoxinas bacterianas se obtuvo utilizando el “EndoFree Plamid Maxi Kit” de Qiagen.

Las enzimas de restricción procedieron de Promega. Los productos de digestión se separaron en geles de agarosa preparados al 1% (peso/vol) con 5 ng/ml de bromuro de etidio (Sigma) en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM Na₂EDTA, pH 8), y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, se utilizaron el “GeneClean II Kit” de Q-BIOgene y el “QIAquick Gel Extraction Kit” de Qiagen. Todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación de las mismas llevada a cabo por la empresa SECUGEN S.A.

1.6.1 Vectores de expresión de vimentina

Los vectores de expresión de la vimentina humana silvestre y mutante en la cisteína 328 en fusión con la proteína fluorescente verde (pEGFP-vimentina WT y pEGFP-vimentina C328S) han sido descritos previamente (Stamatakis *et al.*, 2006). La construcción pCMV6-XL5/h-vimentina se adquirió de Origene.

Para la generación del mutante C328S de la vimentina, se utilizó el “QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit” de Stratagene y los oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación marcada a continuación en rojo:

5'- **GGGCATCCACTTCA****G**AGGTGAGGGACTGCACC -3' y
5'- **GGTGCAGTCCCTCACCT****C**TGAAGTGGATGCCC -3'

1.6.2 Vectores de expresión de las laminas A y C

El vector de expresión de la lamina A humana en fusión con la proteína fluorescente azul (CFP-lamina A WT) fue donado por el Dr. Vicente Andrés (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC). Para su subclonaje en el vector pEGFP-C1, los vectores CFP-lamina A WT y pEGFP-C1 se digirieron en paralelo con las enzimas EcoRI y BamHI simultáneamente, liberando así el DNA codificante de la lamina A y el vector linealizado de pEGFP-C1. Ambos productos, una vez purificados, se unieron mediante la enzima T4 ligasa de Promega. El producto final, GFP-lamina A WT, es un vector de expresión de la lamina A humana en fusión con la proteína fluorescente verde.

Una vez obtenida dicha construcción, se procedió a la generación del vector de expresión de GFP-lamina C humana mediante PCR. Para ello, se utilizó como ADN molde el plásmido GFP-lamina A WT, y la enzima polimerasa empleada fue Pfu Ultra de Stratagene. Se diseñó un oligonucleótido sentido que contenía la secuencia diana para la enzima de restricción EcoRI, marcada en verde, antes del codón de inicio de traducción de la secuencia que codifica la lamina C, marcada en azul. El oligonucleótido antisentido contenía la secuencia diana para la enzima BamHI, marcada en rojo, y la secuencia correspondiente a los 15 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de la lamina C, marcada en azul:

5'- **GC****GAATTCT****ATGGAGACCCCGTCCCAGCGGCGCGCC** -3' y
5'- **CGG****GGATCCTCAGCGGCGGCTACCACTCACGTGGTGGT****GATGGAGCA**
GGTCATCTCC -3'

El producto de PCR y el vector pEGFP-C1, se digirieron en paralelo con las enzimas BamHI y EcoRI simultáneamente. Una vez purificado, el fragmento digerido del vector fue desfosforilado, y se unió al fragmento de PCR mediante la reacción de la enzima T4 ligasa utilizando el “Rapid DNA Dephos and Ligation Kit” de Roche.

Los vectores de expresión de las laminas A y C mutantes en el residuo de cisteína 522 en fusión con la proteína fluorescente verde, GFP-lamina A C522S y GFP-lamina C C522S, fueron obtenidos mediante mutagénesis dirigida, utilizando el “QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit” de Stratagene, y los oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación señalada en rojo:

5'-**CAGAACACCTGGGGC****A**GCGGGAACAGCCTGC-3' y
 5'-**GCAGGCTGTTCCCGC****T**GCCCCAGGTGTTCTG-3'

1.7 OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos usados en este trabajo se sintetizaron de manera automática en un sintetizador Oligo 1000M (Beckman) o en un sintetizador Applied Biosystems 3400 y se purificaron en columnas Sefadex G25, NAPTM suministradas por Amersham, en el Servicio de Química de Proteínas del CIB.

1.8 REACTIVOS DE ELECTROFORESIS

La acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida, el persulfato amónico, la N,N,N',N'-tetrametilendiamida (TEMED), el SDS, la glicina y el Tris, fueron suministrados por Bio-Rad y poseían el grado de pureza apto para electroforesis.

1.9 OTROS REACTIVOS

Las cuantificaciones de proteína se llevaron a cabo mediante el método “BCA Assay” (Pierce). El agua empleada fue de grado reactivo Milli Q (Millipore). La neutravidina agarosa utilizada en la purificación de proteínas biotiniladas procedió de Pierce, mientras que la avidina SoftLink fue suministrada por Promega. La proteína G acoplada a agarosa procedía de Sigma y la proteína A sefarosa de Amersham. La proteína G acoplada a partículas magnéticas utilizada en las inmunoprecipitaciones de las proteínas laminas fue adquirida de Dynal. Las columnas ZipTip C18 fueron suministradas por Millipore. Las tinciones con Coomassie coloidal se realizaron con el reactivo “GelCode Blue Stain Reagent” de Pierce. La iodacetamida biotinilada, los inhibidores de la degradación de proteínas, ZLLL (MG132) y cloroquina, así como el dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como vehículo en las incubaciones con prostaglandinas procedieron de Sigma.

2. MÉTODOS

2.1 CULTIVOS CELULARES

Los fibroblastos de ratón NIH-3T3, las células epiteliales COS-7 (riñón de mono), las células epiteliales SW13 cl.2 (glándula adrenal de humano), los fibroblastos de origen embrionario de ratón (MEFs), las células epiteliales U2OS (osteosarcoma de origen humano) y HEK 293T (riñón de origen humano) fueron cultivadas en medio DMEM, con suero fetal bovino al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y glutamina 2 mM. Las células SW13 cl.2 fueron cedidas generosamente por el Dr. Alfonso J. Sarriá (Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza). Los fibroblastos embrionarios procedentes de ratones deficientes en el gen *LMNA* que codifica las laminas A y C (MEFs *LMNA* KO), así como las células no deficientes (MEFs *LMNA* WT) y las células U2OS fueron un generoso regalo del laboratorio del Dr. Vicente Andrés.

Los pases de estas células adherentes se realizaron mediante tripsinización, lavado con medio completo, centrifugación y resuspensión en medio fresco. Se mantuvieron en cultivo en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C.

2.2 TRATAMIENTOS CELULARES CON cyPG

Los tratamientos se realizaron en medio de cultivo sin suero durante tiempos variables a 37°C. Las prostaglandinas se añadieron disueltas en DMSO y los cultivos controles recibieron un volumen equivalente de DMSO. Los tratamientos se realizaron cuando las células se encontraban a un 80-90% de confluencia. A lo largo de este trabajo se han empleado concentraciones micromolares de cyPG, con las que se han observado la mayor parte de los efectos antiinflamatorios y antiproliferativos descritos en la literatura.

2.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Para determinar la viabilidad de las células NIH-3T3 se realizaron ensayos con el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma) en placas de 12 pocillos. Este método se basa en la medida de absorbancia de los cristales de formazán

que se depositan en el interior de las células debido a la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. Tras los tratamientos correspondientes, las células fueron lavadas con PBS y se añadió el reactivo MTT a una concentración de 0,5 mg/ml en medio RPMI sin rojo fenol. Tras 20 minutos de incubación a 37°C, se retiró el MTT y las células se incubaron durante 10 minutos con una solución de isopropanol 0,1 N HCl. Se procedió posteriormente a la lectura de absorbancia a 540 nm y 690 nm en un espectrofotómetro. La diferencia de las lecturas obtenidas se expresó en porcentajes respecto a la condición control.

2.4 TRANSFECCIONES

2.4.1 Transfecciones transitorias

Las células COS-7, HEK-293T y SW13 cl.2 se transfectaron transitoriamente cuando llegaron a un 80% confluencia. Se usó el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 y se siguieron las indicaciones del fabricante (Invitrogen). Tras 4 horas de transfección (COS-7) o 5 horas (HEK-293T) las células se cultivaron durante 24 horas en medio de cultivo completo antes de realizar los tratamientos. Las células SW13 cl.2 fueron transfectadas transitoriamente durante 5 horas, tras las cuales se mantuvieron en medio DMEM completo durante 48 horas y se procesaron para su observación al microscopio confocal.

Las células U2OS fueron transfectadas transitoriamente cuando llegaron al 80% de confluencia utilizando la técnica de fosfato cálcico descrita anteriormente (Graham y van der Eb, 1973). Para ello, 4 horas antes de la transfección, se cambió el medio de cultivo de estas células por medio completo fresco. A continuación se prepararon 600 µl del tampón HBS 2x (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,05), al que se le añadieron 10 µg de ADN y 60 µl de 2 M CaCl₂. Esta solución se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y a continuación se distribuyó por toda la placa de cultivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se cambió nuevamente el medio.

2.4.2 Transfecciones estables

Para obtener células SW13 cl.2 transfectadas de forma estable con los vectores de expresión de la vimentina WT y del mutante C328S en fusión con GFP, las células fueron transfectadas durante 4 horas utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 y

tras ese tiempo, se retiró el medio de la transfección y fueron cultivadas en medio DMEM con suero fetal bovino al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, 2 mM de glutamina y geneticina como antibiótico de selección a una concentración de 0,8 mg/ml para poder seleccionar la población resistente.

2.5 WESTERN BLOT

Para analizar los niveles celulares de diferentes proteínas, se procedió a homogeneizar las células en tampón de lisis que contenía 10 mM Tris, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM β-mercaptoetanol, inhibidores de proteasas y fosfatasas: 320 µg/ml Pefablock (Roche), 2 µg/ml leupeptina, 0,1 mM ortovanadato sódico, 50 mM NaF (Sigma), y detergentes (NP-40 y SDS a concentraciones finales de 1% y 0,1% respectivamente). La homogeneización se llevó a cabo mediante pases forzados a través de agujas de 26½ G (Becton Dickinson). Entre 20 y 30 µg de proteína total se separaron en geles de SDS-poliacrilamida a diversos porcentajes (10 al 15%) y se transfirieron por método semiseco (BioRad) a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore). Las membranas se bloquearon posteriormente con una solución de leche desnatada en polvo al 2% en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5 y Tween 20 al 0,05%) para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios que reconocían las proteínas de interés.

Posteriormente se realizaron las incubaciones con los anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulinas de ratón, conejo o cabra acoplados a peroxidasa que reconocían los anticuerpos primarios. Para la detección de proteínas biotiniladas, las membranas fueron incubadas con HRP-estreptavidina. Todos los anticuerpos se prepararon en diluciones 1:500-1:10.000 en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) al 1% en TTBS. Los inmunocomplejos y los complejos biotina-estreptavidina se detectaron por quimioluminiscencia con los reactivos ECL. Las señales obtenidas correspondientes a las proteínas de interés se estimaron por análisis densitométrico de las exposiciones y se corrigieron respecto a los niveles de una proteína no relacionada, utilizando para ello un escáner (AGFA) acoplado al análisis informático del programa “Scion Image” de Scion Corporation.

2.6 FRACCIONAMIENTO CELULAR CITOSOL/MEMBRANA

Los lisados celulares obtenidos con tampón de lisis sin detergentes fueron centrifugados a 1.000xg durante 5 minutos a 4°C para eliminar posibles restos de células no rotas. Los

sobrenadantes postnucleares fueron después sometidos a ultracentrifugación a 200.000xg durante 30 minutos a 4°C en un rotor Beckman TLA 100. Se obtuvieron así las fracciones celulares solubles (S100) y de membrana (P100). Los sobrenadantes fueron recogidos y los sedimentos fueron resuspendidos en tampón de lisis.

2.7 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE CÉLULAS MEFs Y U2OS

El protocolo de fraccionamiento subcelular estaba basado en el descrito anteriormente (Schreiber *et al.*, 1989). Tras los tratamientos con las cyPG, las células fueron recogidas en medio TEN (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, pH 7,4), centrifugadas a 4°C, durante 5 minutos a 600xg, y resuspendidas en tampón A compuesto por 10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF y COMPLETE 1X (solución con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas) (Roche). Los tubos se incubaron en hielo durante 15 minutos y se añadió NP-40 a concentración final de 0,5%, se sometieron a “vortex” durante 10 segundos y posteriormente a centrifugación durante 30 segundos a 4°C a 14.000 rpm. El sobrenadante obtenido era la fracción citoplasmática soluble (FCS). Los sedimentos nucleares se resuspendieron en 50 µL de tampón C compuesto por 20 mM HEPES, pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, y COMPLETE 1X. Se sometieron a agitación constante en “vortex” durante 45 minutos a 4°C, y se centrifugaron durante 20 minutos a 14.000 rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido era la correspondiente a la fracción nuclear soluble (FNS). Después de 3 lavados con tampón C, los sedimentos fueron hervidos durante 5 minutos a 95°C en tampón de muestra Laemmli y centrifugados a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante de la última centrifugación correspondió a la fracción nuclear resistente a la extracción (FNRE). Todas las fracciones obtenidas fueron procesadas mediante Western Blot.

2.8 EXTRACCIÓN *IN SITU* DE LA MATRIZ NUCLEAR

El protocolo utilizado para la extracción *in situ* de la matriz nuclear había sido descrito anteriormente (Fey *et al.*, 1984). Las células U2OS o MEFs fueron cultivadas en cubreobjetos y tras dos lavados con PBS se sometieron a extracción con el tampón CSK durante 10 minutos a 0°C (100 mM NaCl, 300 mM sacarosa, 10 mM PIPES, pH 6,8, 3 mM MgCl₂, 0,5% Tritón X-100 y 1 mM PMSF). Tras la eliminación de la fracción soluble resultante, se incubaron 10 minutos a 0°C con el tampón de extracción (250 mM sulfato amónico, 300 mM sacarosa, 10 mM PIPES, pH 6,8, 3 mM MgCl₂, 0,5% Tritón X-100 y

1 mM PMSF). Finalmente, se sometieron a digestión con 100 µg/ml DNasa I en tampón de digestión (50 mM NaCl, 300 mM sacarosa, 10 mM PIPES, pH 6,8, 3 mM MgCl₂, 0,5% Tritón X-100 y 1 mM PMSF) durante 10 minutos a 4 °C, seguida de una incubación de 5 minutos a 20°C en tampón suplementado con sulfato de amonio a concentración final de 250 mM. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% para su posterior análisis al microscopio confocal.

2.9 ISOTERMAS DE UNIÓN DE LBD-PPAR_γ A ANS Y ENSAYOS DE COMPETICIÓN DE LIGANDOS

Las medidas de intensidad de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro PC1 photon counting steady state ISS (Champaign, IL, USA), a 20 °C, utilizando cubetas de cuarzo (Starna, Hinault, UK) cuyo paso óptico fue de 3 x 3 mm. En cada punto de la titulación, el espectro de emisión de fluorescencia fue registrado y los valores de intensidad obtenidos a 465 nm fueron usados para generar las curvas de unión. La emisión de muestras que contenían ANS pero no contenían proteína PPAR_γ fue registrada en las mismas condiciones y restada para eliminar la contribución del fondo. Las isotermas de unión se determinaron a tres longitudes de onda de excitación (350, 375 y 400 nm) con resultados similares. La concentración de LBD-PPAR_γ fue de 0,34 µM, y el tampón de incubación estaba compuesto por 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glicerol y 1 mM TCEP, pH 7,5. Valoraciones paralelas en el mismo tampón pero con 3% en lugar de 10% de glicerol produjeron isotermas idénticas dentro del error, lo que descarta un efecto específico del glicerol sobre la interacción con ANS. En los ensayos de competición, las concentraciones de los ligandos fueron: 0,5 y 1 µM de rosiglitazona, 0,5, 5 y 10 µM de 15d-PGJ₂, 1 y 5 µM de CAY10410, 10 y 20 µM de 15d-PGJ₂-B, y 20 µM de PGA₁. El análisis de las curvas de unión se realizó con el programa BIO-EQS (Rosales y Royer, 2008; Royer *et al.*, 1990).

2.10 ENSAYOS DE COMPETICIÓN DE LIGANDOS DE LBD-PPAR_γ EN GEL

El LBD-PPAR_γ fue incubado durante una hora a temperatura ambiente a concentración final de 1 µM con diversos ligandos en las concentraciones indicadas, o con un volumen equivalente de vehículo (DMSO). El tampón utilizado en las incubaciones se componía de 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5% glicerol y 0,1 mM DTT. A continuación, se añadió a cada mezcla de incubación iodacetamida biotinilada a una concentración final

de 200 μM y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron tratadas con tampón Laemmli y analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% seguida de Western Blot. La detección de la biotina incorporada se realizó mediante la incubación con HRP-estreptavidina y se estimó mediante el análisis densitométrico de las exposiciones. El control de carga de proteína y transferencia se realizó mediante la incubación con el anticuerpo anti-PPAR γ .

2.11 UNIÓN DE PG BIOTINILADAS A LBD-PPAR γ *IN VITRO*

El dominio de unión a ligandos de PPAR γ se incubó a una concentración final de 1 μM durante 2 horas a temperatura ambiente con concentraciones crecientes de 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B, en tampón de incubación compuesto por 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5% glicerol y 0,1 mM DTT. Las muestras se analizaron posteriormente por SDS-PAGE y transferencia a membrana. La incorporación de biotina fue detectada mediante incubación con HRP-estreptavidina y ECL, y posteriormente estimada por comparación con estándares de BSA biotinilada, como anteriormente se ha descrito para la actina (Gayarre *et al.*, 2006).

2.12 ENSAYOS DE PULSO-CAZA

Los fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados en medio de cultivo mínimo con 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B a concentraciones finales de 7 μM y 60 μM respectivamente o con un volumen equivalente de vehículo durante 2 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas con medio completo, y recogidas en PBS a los tiempos indicados. Posteriormente, las células fueron lisadas en tampón de lisis con SDS a concentración final de 0,5% y analizadas por SDS-PAGE. Posteriormente se realizó el mismo ensayo en presencia de inhibidores de la degradación de proteínas, como el ZLLL (inhibidor del proteasoma) a una concentración de 50 nM y cloroquina (inhibidor de la acidificación lisosomal) a 10 μM . Estos inhibidores se añadieron a la hora y media del inicio del tratamiento con las cyPG, y nuevamente después de lavar las células con medio de cultivo completo. Las células se recogieron a los tiempos indicados en PBS y fueron lisadas como se describe anteriormente.

2.13 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MARCADAS CON PGA₁-B MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN RESINA DE AVIDINA-AGAROSA

Las células NIH-3T3 fueron tratadas con PGA₁-B a una concentración final de 60 μ M o con un volumen equivalente de vehículo (DMSO) durante 2 horas. El mismo protocolo se llevó a cabo en el caso de las células COS-7 transfectadas con los plásmidos de expresión de la vimentina humana silvestre o el mutante C328S en fusión con GFP. Los correspondientes lisados celulares se obtuvieron y 50 μ g de proteína total se incubaron con la resina de neutravidina agarosa durante 1 hora a 4°C con agitación constante. Las proteínas no unidas se eliminaron mediante centrifugación de la mezcla de incubación a 2.500xg durante 2 minutos y posteriores lavados de la resina con tampón de lisis con 1% NP-40 y 0,1% SDS. Las proteínas retenidas fueron eluidas mediante incubación en tampón de Laemmli 2X a 100°C durante 5 minutos. Las muestras se sometieron posteriormente a análisis mediante Western Blot.

2.14 MODIFICACIÓN DE VIMENTINA RECOMBINANTE *IN VITRO*

La vimentina recombinante fue incubada a temperatura ambiente durante 2 horas en 5 mM PIPES, pH 7,0, 0,1 mM DTT, en presencia de vehículo (DMSO) o los diversos aceptores de Michael, a las concentraciones indicadas en las correspondientes figuras. Para el análisis de la incorporación de PGA₁-B a la vimentina, las alícuotas de la incubación fueron sometidas a SDS-PAGE y transferidas a membranas Immobilon-P. La incorporación de biotina fue detectada mediante incubación con HRP-estreptavidina y ECL, y posteriormente estimada por comparación con estándares de BSA biotinilada.

Para el análisis de espectrometría de masas (MS), la vimentina fue digerida con tripsina (Boehringer) en relación 80: 1 (vimentina: tripsina) durante 20 horas a 37 °C. Los péptidos resultantes fueron purificados con columnas ZipTip C18 (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron mezcladas con ácido α -ciano-4-hidroxycinámico (Bruker-Daltonics) en una solución acuosa al 50% de acetonitrilo y 25% de ácido trifluoroacético (99,5% pureza, Sigma). Esta mezcla fue analizada mediante MS por MALDI-TOF (ionización/desorción mediante láser asistida por matriz-tiempo de vuelo), obteniéndose la huella peptídica de las proteínas. En determinados casos se obtuvo la secuencia de los péptidos de interés mediante fragmentación por MS/MS

MALDI-TOF/TOF. Los análisis de los datos de masas obtenidos fueron llevados a cabo usando programas de FlexAnalysis y BioTools (Bruker-Daltonics).

Los péptidos biotinilados de la vimentina modificada por PGA₁-B fueron enriquecidos por adsorción a avidina SoftLink (Promega). Después de lavar, los péptidos unidos a la resina de avidina fueron eluidos con ácido acético al 10% y se realizó directamente el análisis de MS por MALDI-TOF.

2.15 MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA PARA LA MODIFICACIÓN POR PGA₁-B *IN VITRO*

Una mezcla de proteínas recombinantes compuesta por α -actinina, Hsp90 α , GAPDH y actina disueltas a concentración final de 3 μ M en tampón 20 mM Tris, pH 7, 45 mM NaCl y 5 mM MgCl₂, fue incubada con concentraciones crecientes de PGA₁-B o con un volumen equivalente de vehículo (DMSO) durante una hora a temperatura ambiente. Para los ensayos de competición, la mezcla de proteínas fue incubada con un exceso de PGA₁ durante 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación con PGA₁-B a una concentración final de 1 μ M durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras resultantes fueron procesadas para su posterior análisis por Western Blot. La incorporación de PGA₁-B fue detectada mediante incubación con HRP-estreptavidina y ECL, y las proteínas de interés mediante incubación con anticuerpos específicos. La proteína total fue detectada mediante la tinción de las membranas con Coomassie coloidal.

2.16 INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la inmunoprecipitación de proteínas utilizamos muestras de las fracciones citosólicas de fibroblastos NIH-3T3 tratados previamente con PGA₁-B a una concentración final de 60 μ M. Entre 50 y 100 μ g de proteína total fueron incubados con el anticuerpo correspondiente (0,5-1 μ g) durante 1 hora a 4°C con agitación constante. Seguidamente se incubó la muestra con 50 μ l de resina acoplada a proteína G o a proteína A, durante 1 hora a 4°C con agitación constante. Las proteínas no retenidas fueron eliminadas mediante centrifugación a 1.500xg durante 2 minutos. Después de varios lavados con tampón de lisis, se procedió a la elución de las proteínas retenidas mediante incubación de la resina con el tampón de Laemmli 2X a 100°C durante 5 minutos. Las proteínas de interés fueron posteriormente sometidas a análisis mediante Western Blot.

Para la inmunoprecipitación de las laminas A y C acopladas a GFP, las células HEK-293T fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión correspondientes, y fueron tratadas con las prostaglandinas 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B, a concentraciones finales de 7 μ M y 30 μ M respectivamente, o con un volumen equivalente de vehículo en las condiciones control. Posteriormente fueron lisadas en tampón de lisis (50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2,5 mM EGTA, 10% glicerol, 0,1% Tween-20, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, inhibidores de proteasas y fosfatasa: 320 μ g/ml Pefablock, 2 μ g/ml leupeptina, 0,1 mM ortovanadato sódico, 50 mM NaF). Se incubaron 600 μ g de proteína total con 2 μ g del anticuerpo anti-GFP o del anticuerpo utilizado como control negativo por ser del mismo isotipo, anti-LBPA, durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Al día siguiente, se incubó la muestra con 40 μ l de proteína G acoplada a partículas magnéticas durante una hora a 4°C en agitación constante. Las proteínas no retenidas se eliminaron, y tras varios lavados en PBS, las proteínas retenidas fueron eluidas en tampón de Laemmli 2X a 100°C durante 5 minutos y a continuación sometidas a análisis mediante Western Blot. Las membranas resultantes fueron incubadas con HRP-estreptavidina, anti-lamina A/C y anti-GFP.

2.17 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

2.17.1 Estudio de la vimentina

Las células SW13 cl.2 transfectadas de forma estable con los vectores de expresión de la vimentina WT y el mutante C328S en fusión con GFP fueron cultivadas en placas de 35 mm de diámetro con fondo de vidrio. Se procedió a la fijación de las células con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos para su observación al microscopio confocal Leica (Leica TCS-SP2-AOBS). Se utilizó un objetivo de 63 aumentos y se obtuvieron secciones cada 0,5 μ m.

2.17.1.1 Ensayos de inmunofluorescencia para el estudio de la vimentina

Las células SW13 cl.2 fueron sembradas en placas de 35 mm de diámetro con fondo de vidrio y transfectadas con los plásmidos pCMV6-XL5-vimentina WT y mutante C358S. Tras 48 horas de expresión, las células fueron fijadas con solución de paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, permeabilizadas con 0,1% Tritón X-100 en PBS durante 20 minutos y bloqueadas con una solución de BSA al 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-vimentina durante 1 hora seguida de incubación con el anticuerpo secundario acoplado a A488 y con DAPI durante 1 hora en oscuridad. Tras las incubaciones, se lavaron con PBS y se

observaron al microscopio confocal Leica (Leica TCS-SP2-AOBS) disponible en el Servicio de Microscopía del CIB. Se utilizó un objetivo de 63 aumentos y se obtuvieron secciones cada 0,5 μm .

2.17.2 Estudio de las laminas A y C

Las células U2OS fueron cultivadas en cubreobjetos, transfectadas con CFP-lamina A humana, y tratadas con las cyPG biotiniladas o vehículo. Tras los tratamientos, se sometieron a extracción *in situ* de la matriz nuclear, y fijadas en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Posteriormente se permeabilizaron con 0,5% Tritón X-100 durante 30 minutos y se incubaron con estreptavidina acoplada a A594 durante 45 minutos a temperatura ambiente y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medio de montaje SlowFade Gold (Invitrogen). Las muestras se observaron en el microscopio confocal TCS/SP2 (LEICA MICROSYSYSTEMS, Wetzlar, Alemania), disponible en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV, CSIC) con objetivo de inmersión en aceite 63X. Los análisis de los perfiles de colocación fueron realizados mediante el empleo del software MetaMorph.

2.17.2.1 Ensayos de inmunofluorescencia para el estudio de las laminas

Las U2OS o MEFs sembradas en cubreobjetos, una vez tratadas con las cyPG biotiniladas o vehículo, fueron sometidas a extracción *in situ* y fijadas posteriormente en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. A continuación se bloquearon en solución de glicina 10 mM, pH 8,5 durante 5 minutos, y se permeabilizaron con 0,5% Tritón X-100 durante 30 minutos. Se incubaron en solución de bloqueo (5% leche, 10% FBS, 0,5% BSA, 0,1% Tritón X-100 en PBS), y posteriormente con los correspondientes anticuerpos primarios preparados en solución de BSA al 3% en PBS durante la noche a 4 °C. Al día siguiente se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo secundario y la estreptavidina acoplados a los correspondientes fluoróforos. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos y se observaron en el microscopio confocal siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior.

2.18 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar estadístico. El análisis estadístico de la diferencia de los valores medios obtenidos en las distintas condiciones experimentales se llevó a cabo mediante el test t de Student para muestras no pareadas o por análisis de varianzas (ANOVA). Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. ESTABILIDAD DE LA MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES POR cyPG

Las cyPG poseen una reactividad característica que les permite ejercer gran parte de sus efectos biológicos mediante la unión covalente a proteínas. Se ha descrito que la modificación de tioles solubles por las cyPG es reversible, mientras que la modificación *in vitro* de tioles inmovilizados se revierte únicamente a pH fuertemente básicos (Noyori y Suzuki, 1993).

Con estos antecedentes, nos planteamos en primer lugar caracterizar la estabilidad de la modificación de proteínas celulares por cyPG en células intactas. Empleando los fibroblastos NIH-3T3 como modelo celular, nos centramos en el estudio de la modificación de proteínas por los análogos biotinilados de una prostaglandina con estructura dienona, como la 15d-PGJ₂ y otra con estructura enona sencilla, como la PGA₁. Los fibroblastos tratados con las cyPG biotiniladas, fueron lisados y las muestras procesadas y analizadas posteriormente por Western Blot.

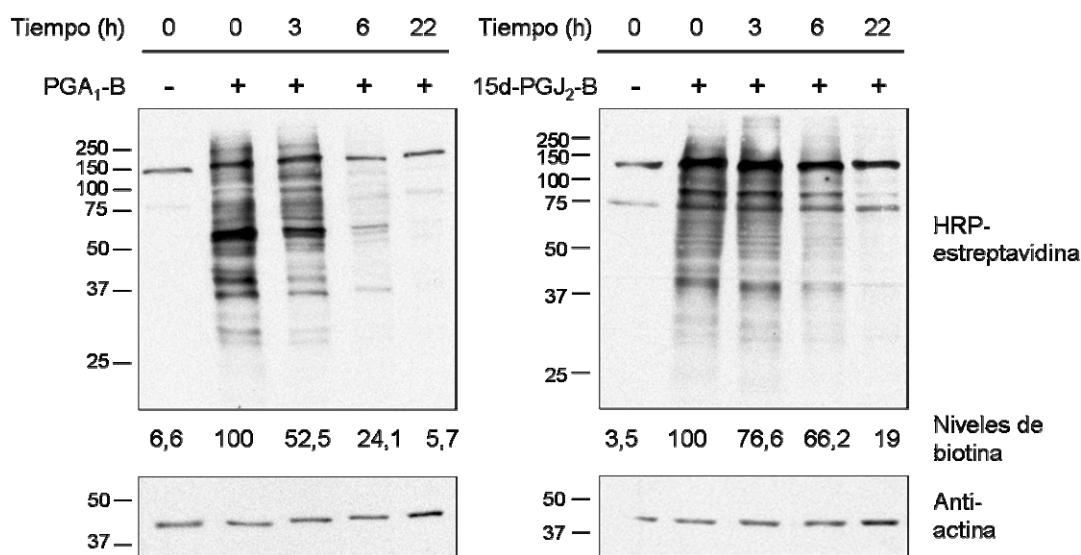


Figura 6. Estudio de la estabilidad de la modificación de proteínas celulares por PGA₁-B y 15d-PGJ₂-B. Los fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados con PGA₁-B o 15d-PGJ₂-B a concentraciones finales de 7 μ M y 60 μ M respectivamente o con un volumen equivalente de vehículo (DMSO) durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas con medio completo y recogidas en PBS a los tiempos indicados. Los extractos celulares fueron analizados por SDS-PAGE y la incorporación de biotina fue analizada por Western Blot mediante incubación con HRP-estreptavidina y cuantificada mediante análisis densitométrico (se representan los valores de la media de 2 experimentos). La señal obtenida con el anticuerpo anti-actina se usó como control de carga y de transferencia de las muestras.

Tras la incubación de las membranas con HRP-estreptavidina, se pudo observar un descenso de la señal de biotina con el tiempo. Si comparamos ambas cyPG, la desaparición de la señal de biotina fue más rápida en el caso de la modificación por $\text{PGA}_1\text{-B}$. Tras el tratamiento de las células con esta cyPG, la señal de biotina disminuye a las 3 horas desde la retirada del compuesto, mientras que en el caso de la $15\text{d-PGJ}_2\text{-B}$, son necesarias 6 horas para observar un descenso apreciable de señal (Figura 6).

Para poder descartar que este descenso de las señales de biotina fuera debido a la degradación de proteínas, el ensayo se realizó en presencia de ZLLL, inhibidor del proteasoma, y de cloroquina, inhibidor de la acidificación de los lisosomas.

Como puede apreciarse en la figura 7A, la disminución a lo largo del tiempo de las señales de las proteínas modificadas por ambas cyPG biotiniladas resultó similar a la observada previamente. Para comprobar la efectividad de los inhibidores de la degradación de proteínas exploramos los niveles de proteínas ubiquitinadas. Observamos que en presencia de los inhibidores se producía una acumulación de proteínas no degradadas, que era ligeramente mayor a las 3 horas de la retirada del tratamiento con ambas prostaglandinas, pero la inhibición de la degradación de proteínas fue efectiva en todas las condiciones experimentales (Figura 7B).

El descenso observado en el tiempo de la señal de proteínas modificadas por ambas cyPG no puede explicarse por un mecanismo dependiente de la degradación de proteínas. El conjunto de nuestros resultados sugiere que la modificación de proteínas por cyPG no es estable en células intactas.

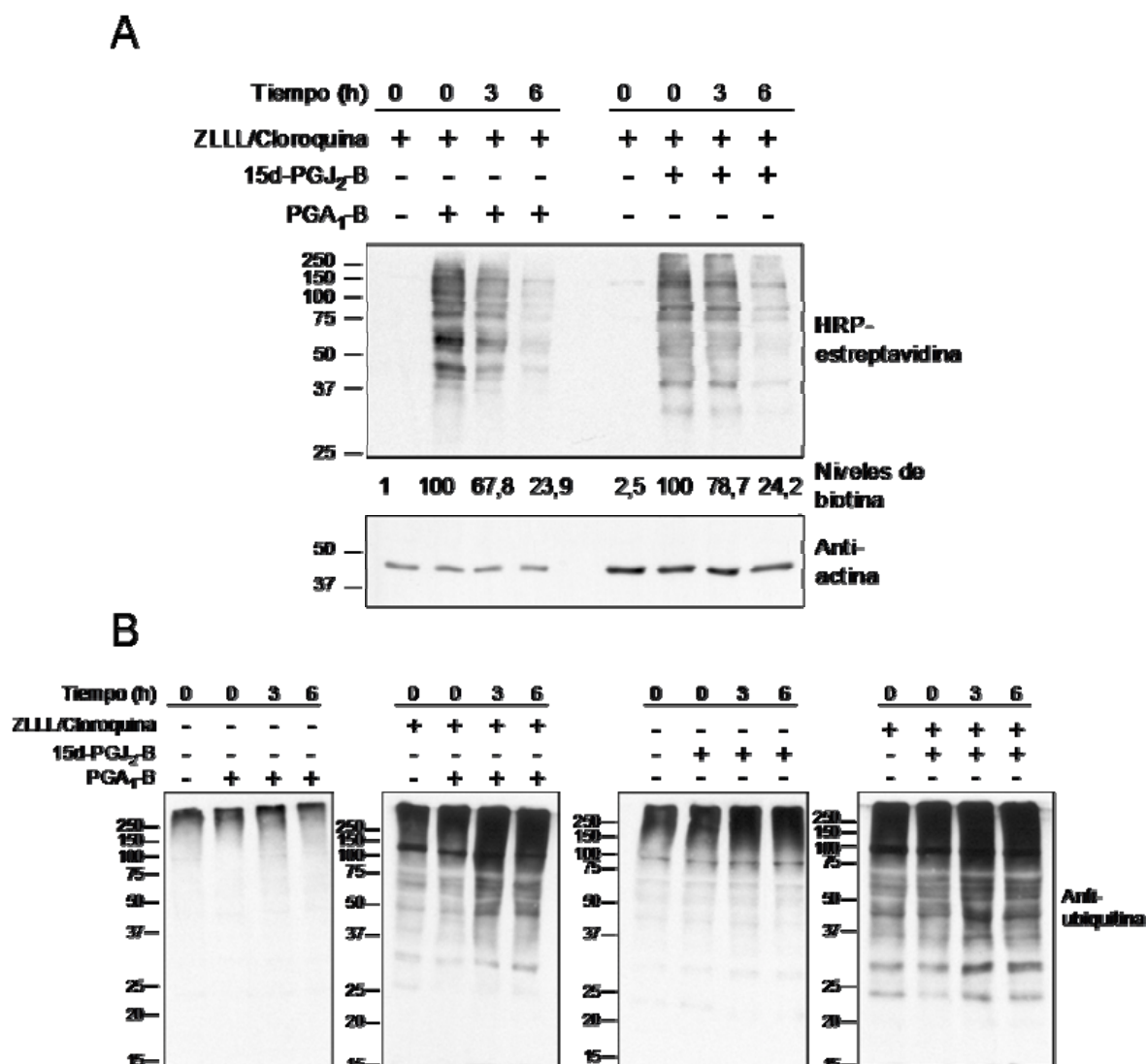


Figura 7. Estudio de la estabilidad de la modificación de proteínas celulares por PGA₁-B y 15d-PGJ₂-B en presencia de inhibidores de la degradación de proteínas. (A) Se llevaron a cabo tratamientos de los fibroblastos NIH-3T3 con PGA₁-B o 15d-PGJ₂-B a concentraciones finales de 7 μ M y 60 μ M respectivamente o con un volumen equivalente de vehículo (DMSO) durante 2 horas en presencia de inhibidores de la degradación de proteínas (ZLLL 50 nM y cloroquina 10 μ M). Transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas y se añadió medio de cultivo nuevo, suplementado con ZLLL y cloroquina. (B) Las células fueron tratadas en presencia de los agentes indicados como se ha detallado para el panel A. Las células fueron recogidas en PBS a los tiempos indicados. La incorporación de biotina fue analizada posteriormente por Western Blot mediante incubación con HRP-estreptavidina y cuantificada mediante análisis densitométrico (se representa la media de los valores obtenidos en 2 experimentos). La señal de actina se usó como control de carga de proteína total (A) y las proteínas ubiquitinadas fueron detectadas mediante incubación con anti-ubiquitina (B).

2. ESTUDIO DE LA UNIÓN DE cyPG AL DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDOS DE PPAR γ

Parte de los efectos biológicos de las cyPG se debe a que algunas son capaces de activar los receptores nucleares de la familia de PPAR. Tal es el caso de la 15d-PGJ₂, y la PGA₁ (Forman *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1995). Resultados previos de nuestro laboratorio mediante ensayos con plásmidos de genes reporteros de PPAR, mostraron que 15d-PGJ₂ y PGA₁ inducen la activación de PPAR en células mesangiales de rata, sin embargo, los análogos biotinilados no desencadenaron ninguna activación (Garzon *et al.*, 2010; Zorrilla *et al.*, 2010).

Para poder explicar los efectos de las cyPG y sus análogos biotinilados sobre la activación de PPAR en modelos celulares, nos planteamos la posibilidad de que se debieran a diferencias en la interacción con el dominio de unión a ligandos de PPAR γ (LBD-PPAR γ). Para ello, estudiamos la unión de dichas cyPG al LBD-PPAR γ siguiendo diversos abordajes.

2.1 ENSAYO DE COMPETICIÓN DE LIGANDOS DE LBD-PPAR γ BASADO EN LA EMISIÓN DE FLUORESCENCIA

El fluoróforo ANS ha sido ampliamente utilizado en el estudio de la hidrofobicidad de las proteínas, y se ha empleado en diversas aplicaciones, como en el estudio del reconocimiento de bolsillos hidrofóbicos de las proteínas, la determinación de los ajustes estructurales durante el plegamiento proteico, así como de la unión de fármacos a proteínas diana (Collini *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 1995; Kane y Bernlohr, 1996; Wang *et al.*, 2006). El dominio de unión a ligandos de PPAR γ es un bolsillo compuesto de una zona constituida por residuos hidrofóbicos y una zona cargada, y es por tanto idóneo para la unión de ANS.

En experimentos de unión de ANS al dominio de unión a ligandos de PPAR γ se observó un aumento del rendimiento cuántico del fluoróforo junto con un desplazamiento en el espectro de emisión hacia el azul respecto al espectro obtenido en ausencia de LBD-PPAR γ , característicos de la interacción de ANS con proteínas (Stryer, 1965; Zorrilla *et al.*, 2010).

Sirviéndonos del ensayo de unión de ANS al LBD-PPAR γ , puesto a punto en el laboratorio de la Dra. Silvia Zorrilla, nos propusimos estudiar la competición de diversos ligandos de PPAR γ por la unión al LBD. Se llevaron a cabo ensayos de competición de ANS por el bolsillo hidrofóbico de LBD-PPAR γ con tres ligandos conocidos de PPAR γ , como son la rosiglitazona, la 15d-PGJ $_2$ y el CAY10410, así como con la PGA $_1$.

Para ello, se realizaron titulaciones de PPAR γ con ANS en presencia de concentraciones conocidas y constantes de los ligandos competidores. Analizando los perfiles de afinidad, se observó que en los casos de la rosiglitazona, la 15d-PGJ $_2$ y el CAY10410, existía una pérdida significativa en la intensidad de emisión de fluorescencia a 465 nm, que es característica de la existencia de competición de dichos compuestos con el fluoróforo por el bolsillo del dominio de unión a ligandos de la proteína. En el caso de la PGA $_1$, dicho desplazamiento no se produjo, ni a concentraciones tales como 20 μ M, indicando que esta cyPG no es ligando de PPAR γ en este ensayo (Figura 8).

Para cada ligando, las curvas determinadas a diferentes concentraciones del competidor fueron ajustadas mediante un modelo en el que se postularon dos complejos distintos: ANS/LBD-PPAR γ y ligando/LBD-PPAR γ . En los ajustes, la energía libre de formación del complejo ANS/LBD-PPAR γ fue fijada en un valor resultante del análisis de los perfiles obtenidos en ausencia del competidor ($\Delta G = -6,7$ kcal/mol). Las energías libres de formación de los complejos rosiglitazona/LBD-PPAR γ , 15d-PGJ $_2$ /LBD-PPAR γ y CAY10410/LBD-PPAR γ calculadas correspondieron a $\Delta G = -9,1 \pm 0,1$ kcal/mol ($K_d = 170$ nM), $\Delta G = -8,0 \pm 0,2$ kcal/mol ($K_d = 1,1$ μ M), $\Delta G = -7,4 \pm 0,2$ kcal/mol ($K_d = 3,2$ μ M), respectivamente. Como control negativo, el ensayo de competición se repitió en presencia de Wy14,643, ligando de PPAR α pero no de PPAR γ . Como era de esperar para este compuesto, no se observó ningún desplazamiento del ANS (resultados no mostrados).

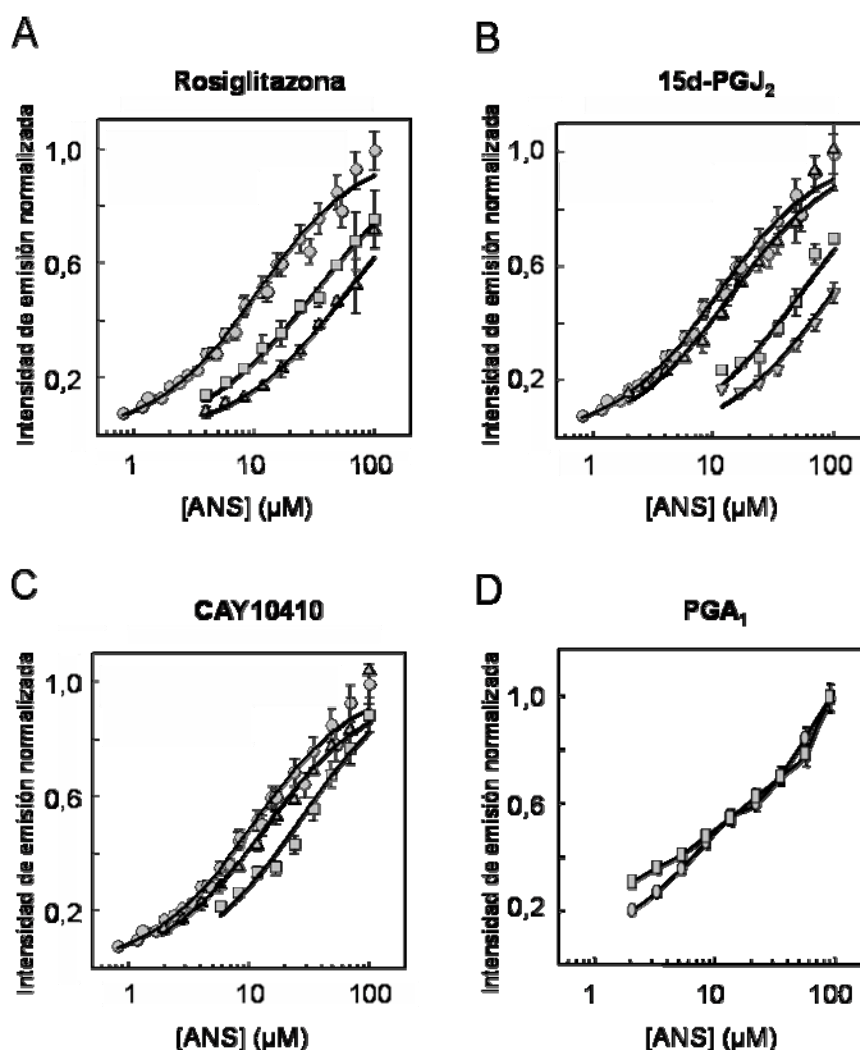


Figura 8. Curvas de afinidad de los complejos de LBD-PPAR γ con rosiglitazona, 15d-PGJ₂, CAY10410 y PGA₁. Se analizó la capacidad de diversos ligandos para desplazar la unión de ANS al LBD-PPAR γ mediante ensayos de emisión de fluorescencia. (A) Las concentraciones de rosiglitazona fueron de 0 μM (\bullet), 0,5 μM (\blacksquare) y 1 μM (\blacktriangle). (B). Las concentraciones de 15d-PGJ₂ fueron de 0 μM (\bullet), 0,5 μM (\blacktriangle), 5 μM (\blacksquare) y 10 μM (\blacktriangledown). (C) Las concentraciones de CAY10410 fueron de 0 μM (\bullet), 1 μM (\blacktriangle) y 5 μM (\blacksquare). (D). Las concentraciones de PGA₁ fueron de 0 μM (\bullet) y 20 μM (\blacksquare). La concentración final de LBD-PPAR γ en todos los casos fue de 0,34 μM . Cada resultado corresponde a la media de al menos 3 titulaciones \pm el error estándar de la media. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 375 nm y 465 nm respectivamente.

2.2 ENSAYO DE COMPETICIÓN EN GEL DE LIGANDOS DE LBD-PPAR γ CON IODACETAMIDA BIOTINILADA

Diversos compuestos lipídicos reactivos han demostrado su capacidad para unirse al residuo de cisteína 285 de PPAR γ presente en el bolsillo de unión a ligandos mediante la formación de un aducto covalente (Shiraki *et al.*, 2005; Waku *et al.*, 2009b). La interacción

covalente de estos ligandos hace que la cisteína esté menos accesible para la modificación de este residuo por otros compuestos. Partiendo de estas premisas, quisimos ampliar los resultados obtenidos en los ensayos de competición basados en la emisión de fluorescencia, y nos planteamos a continuación ensayos de competición *in vitro* de un ligando bien caracterizado de PPAR γ , como es la 15d-PGJ $_2$, por el LBD-PPAR γ con la iodacetamida biotinilada (IA-B), que es un reactivo general de cisteínas.

Como se observa en la figura 9A, la cyPG protegía al LBD-PPAR γ de la unión de la IA-B en una forma dependiente de la concentración. El mismo ensayo se realizó con diversos agonistas de PPAR γ , como el ANS, la rosiglitazona y el CAY10410, y sólo en el caso de los ligandos capaces de unirse covalentemente al dominio de unión de PPAR γ , como la 15d-PGJ $_2$ y el CAY10410, se observó una disminución en la unión a IA-B (Figura 9B). Ni la rosiglitazona ni el ANS evitaron la unión de IA-B en nuestras condiciones experimentales.

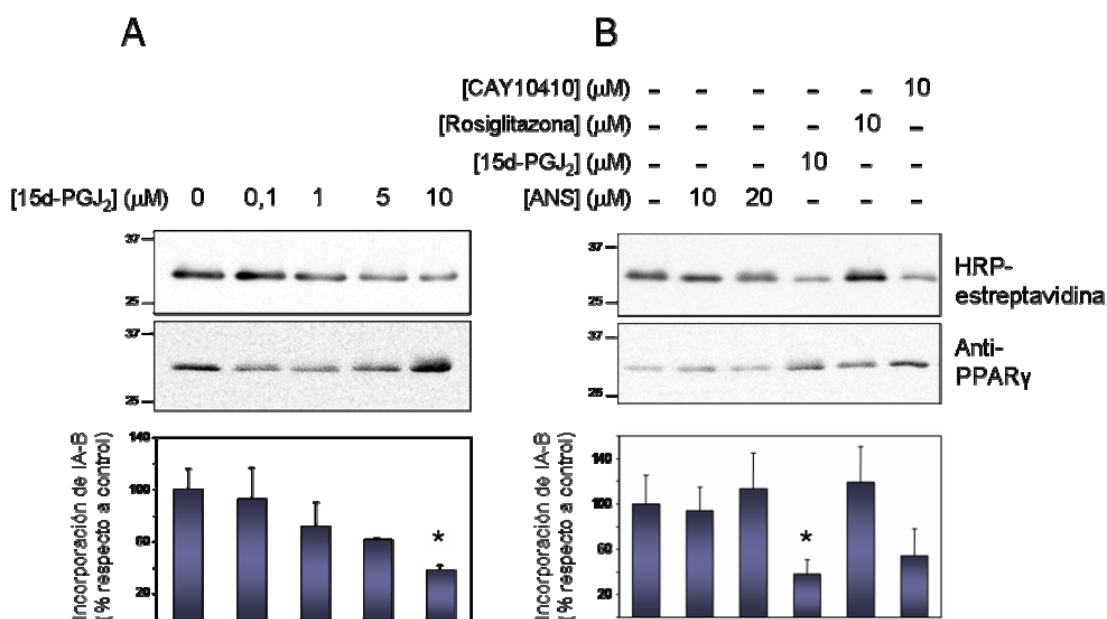


Figura 9. Competición de ligandos de PPAR γ con iodacetamida biotinilada por la unión al LBD. El LBD-PPAR γ a concentración final de 1 μ M fue incubado durante 1 hora a temperatura ambiente con 15d-PGJ $_2$ a las concentraciones indicadas (A) o con diversos ligandos (B). Posteriormente se añadió en cada mezcla de incubación iodacetamida biotinilada (IA-B) a una concentración final de 200 μ M, se incubaron las muestras durante 30 minutos y se procesaron por SDS-PAGE. La detección de la biotina incorporada se realizó por Western Blot mediante la incubación con HRP-estreptavidina y se estimó mediante el análisis densitométrico de las exposiciones. El control de carga de proteína se realizó mediante la incubación con anti-PPAR γ . Las exposiciones mostradas son representativas de 5 experimentos independientes y los resultados muestran la media de las cuantificaciones densitométricas de 5 experimentos \pm el error estándar de la media (*p<0,05 según análisis de varianzas).

2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE 15d-PGJ₂-B Y PGA₁-B A LBD-PPAR_γ

Para explorar la interacción de los análogos biotinilados de las prostaglandinas con el dominio de unión a ligandos de PPAR_γ, realizamos ensayos *in vitro* en los que el LBD-PPAR_γ fue incubado con concentraciones crecientes de 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B. La señal de biotina incorporada se detectó mediante la incubación de las membranas con HRP-estreptavidina. Como podemos observar en la figura 10A, la incorporación de ambos compuestos biotinilados fue dependiente de la concentración, observándose una incorporación máxima a concentraciones de 50 μM en ambos casos. Mediante una semicuantificación de las señales de biotina obtenidas, calculamos que la modificación del LBD-PPAR_γ llevada a cabo por ambos compuestos, asumiendo que solo se modifica la cisteína 285, supuso alrededor del 25% del total del LBD-PPAR_γ, ya que la medida de la unión fue aproximadamente de 0,25 moles de 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B por mol de LBD-PPAR_γ (Figura 10B).

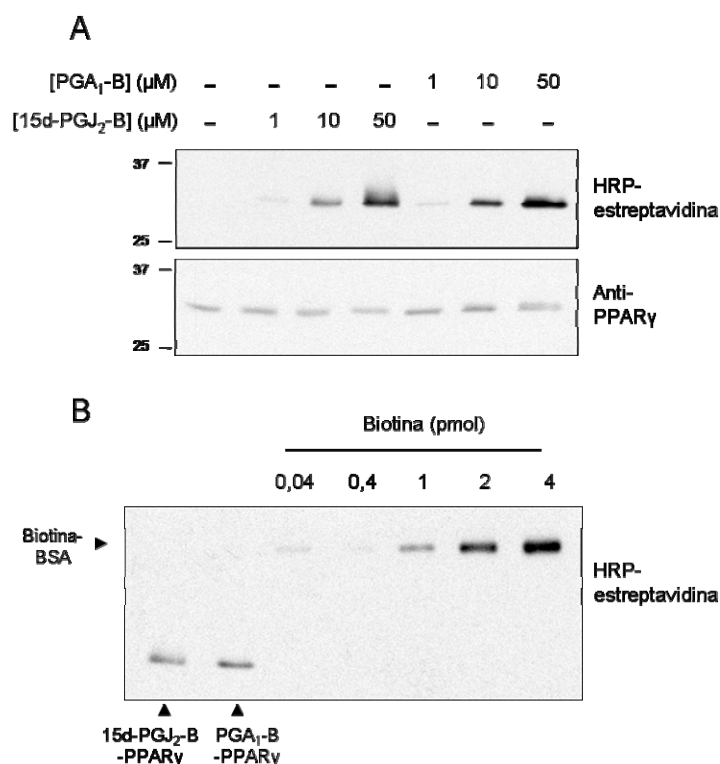


Figura 10. Modificación *in vitro* de LBD-PPAR_γ por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B. El LBD-PPAR_γ a una concentración final de 1 μM fue incubado durante 2 horas a temperatura ambiente con las cyPG biotiniladas a las concentraciones indicadas (A) o a 50 μM (B). Una alícuota de la incubación que contenía 4 pmoles de LBD-PPAR_γ fue analizada en paralelo con estándares de BSA biotinilada (B). La incorporación de biotina fue detectada por Western Blot mediante incubación con HRP-estreptavidina y posteriormente cuantificada por análisis densitométrico. El control de carga de proteína se realizó mediante incubación con anti-PPAR_γ. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos en cada caso.

Una vez observada la modificación del LBD-PPAR γ *in vitro* por las cyPG biotiniladas, quisimos determinar si los análogos biotinilados reproducían los perfiles de afinidad por el LBD-PPAR γ obtenidos anteriormente con las cyPG sin biotinilar. Basándonos en los ensayos descritos anteriormente, nos centramos en el estudio de la 15d-PGJ₂ y su análogo biotinilado, ya que la PGA₁ no había mostrado afinidad de unión por el LBD-PPAR γ . Para ello se llevaron a cabo ensayos de competición de ANS por LBD-PPAR γ con la 15d-PGJ₂-B. La energía libre de formación del complejo 15d-PGJ₂-B/LBD-PPAR γ calculada tras el ajuste de los perfiles fue de $-6,6 \pm 0,2$ kcal/mol ($K_d = 12$ μ M). Esto indica que la 15d-PGJ₂-B se une al LBD PPAR γ , pero con una afinidad 10 veces inferior a la que se obtiene para la 15d-PGJ₂ (Figura 11).

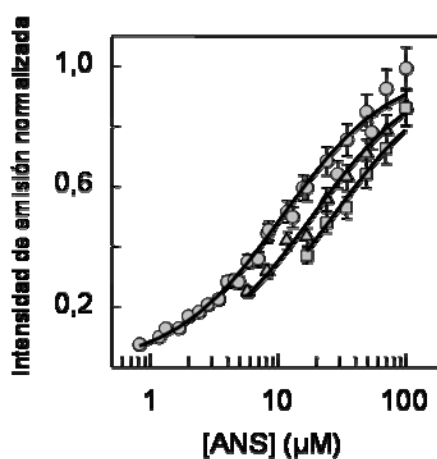


Figura 11. Curvas de afinidad de los complejos de LBD-PPAR γ con 15d-PGJ₂-B. Se analizó la capacidad de 15d-PGJ₂-B para desplazar la unión de ANS al LBD-PPAR γ mediante ensayos de emisión de fluorescencia. Las concentraciones de 15d-PGJ₂-B fueron de 0 μ M (●), 10 μ M (▲) y 20 μ M (■). La concentración de LBD-PPAR γ fue de 0,34 μ M en todos los casos. Cada punto mostrado corresponde a la media de 3 determinaciones \pm el error estándar de la media. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 375 nm y 465 nm respectivamente.

3. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA PGA₁ Y SU ANÁLOGO BIOTINILADO

Con la finalidad de comprobar si la PGA₁-B es una herramienta válida para la identificación de dianas implicadas en los efectos biológicos de la PGA₁, exploramos su capacidad para reproducir los efectos de la prostaglandina original. En ensayos previos del laboratorio se habían estudiado algunos de los efectos de ambos compuestos sobre la respuesta inflamatoria. El tratamiento de células mesangiales de rata con PGA₁-B inhibió la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en respuesta a citoquinas proinflamatorias de forma similar a PGA₁. Ambas PG desencadenaron también

un efecto bifásico en la inducción de COX-2 y en la expresión de la Hsp70, ya que con concentraciones bajas de ambos compuestos se indujo la expresión de COX-2 y de Hsp70, mientras que con concentraciones mayores (60 μ M), se redujo considerablemente la inducción de ambas proteínas (Garzon *et al.*, 2010).

En el contexto de este trabajo nos planteamos evaluar la capacidad de la PGA₁-B para reproducir otros efectos biológicos de la PGA₁, como el efecto de esta cyPG sobre la proliferación celular o la inducción de proteínas implicadas en la protección celular tras estrés oxidativo.

3.1 EFECTOS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Es ampliamente conocido que las prostaglandinas ciclopentenonas como PGA₁ o PGJ₂ inducen apoptosis en numerosos tipos celulares (Erl *et al.*, 2004) e inhiben la proliferación celular (Narumiya y Fukushima, 1986). Por ello exploramos los efectos del análogo biotinilado de la PGA₁ sobre la viabilidad de fibroblastos NIH-3T3.

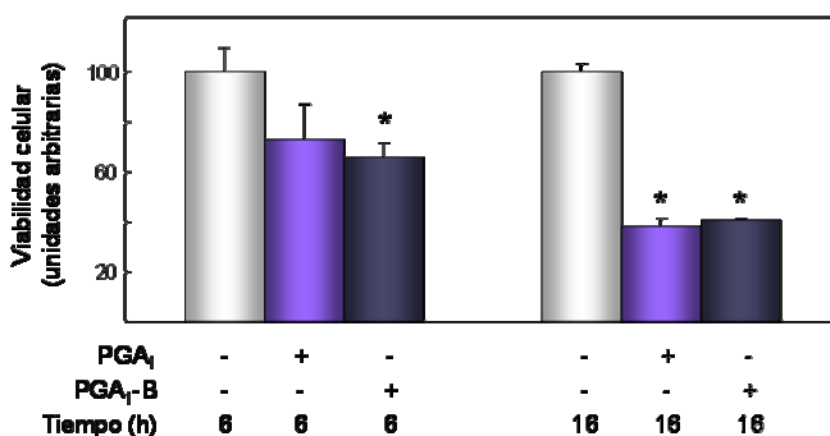


Figura 12. Determinación de la viabilidad celular. Los fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados durante 6 y 16 horas con PGA₁ o PGA₁-B a una concentración de 60 μ M o con un volumen equivalente de vehículo (DMSO). La viabilidad celular fue estimada mediante el ensayo MTT y los resultados se expresaron como porcentaje de los valores obtenidos en la condición control. Los resultados son la media \pm error estándar de 4 experimentos (* $p < 0,05$ respecto al control, según test *t* Student).

En células tratadas con PGA₁ o PGA₁-B observamos un descenso en la viabilidad celular, según fue estimado mediante el ensayo MTT, que comenzó a apreciarse tras 6 horas de tratamiento y que fue más acusado tras 16 horas de tratamiento. En todos los casos, la magnitud del efecto observado fue similar con ambas prostaglandinas (Figura 12). Estos

resultados demuestran que el comportamiento de ambos prostanoïdes en relación con la inducción de muerte celular es comparable, y que ambas prostaglandinas pueden desencadenar un descenso en la viabilidad celular de forma reproducible.

3.2 EFECTO DE LA PGA_1 Y LA $\text{PGA}_{1\text{-B}}$ SOBRE LOS NIVELES DE HEMOOXIGENASA 1

Se ha descrito que las prostaglandinas de la serie A inducen la síntesis de hemooxigenasa 1 (HO-1) en diversos modelos celulares, que incluyen mioblastos murinos (Rossi y Santoro, 1995) y células de neuroblastoma (Yan *et al.*, 2005). Decidimos explorar el posible efecto inductor de la PGA_1 y $\text{PGA}_{1\text{-B}}$ sobre la expresión de HO-1 en células NIH-3T3.

En fibroblastos NIH-3T3 observamos que tanto la PGA_1 como la $\text{PGA}_{1\text{-B}}$ a concentraciones de 30 y 60 μM inducían un aumento en los niveles de la enzima HO-1, de aproximadamente 6 a 8 veces con respecto al control. Es por tanto evidente que ambos compuestos producen una inducción de la HO-1 y de similar magnitud (Figura 13).

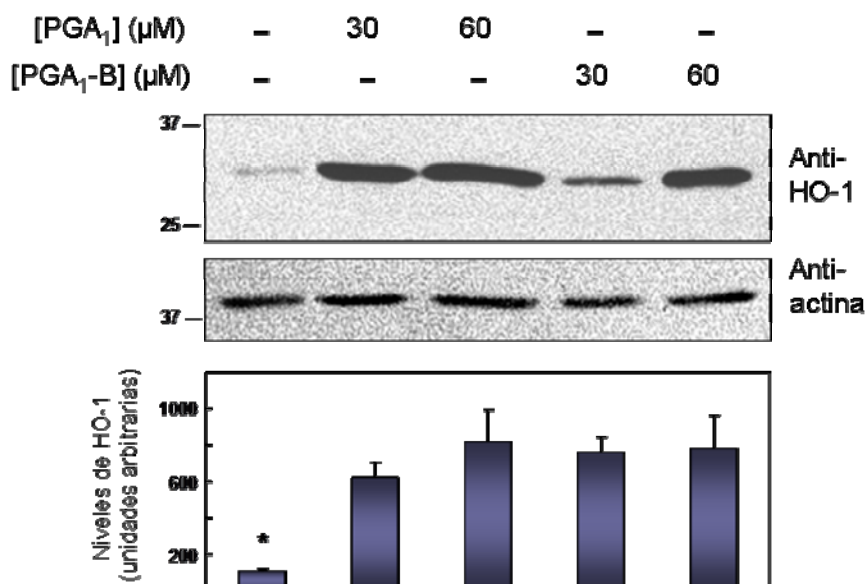


Figura 13. Efecto de PGA_1 y $\text{PGA}_{1\text{-B}}$ sobre los niveles de HO-1. Los fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados durante 6 horas con PGA_1 o $\text{PGA}_{1\text{-B}}$ a concentraciones finales de 30 y 60 μM o con un volumen equivalente de vehículo (DMSO). Los niveles de HO-1 y de actina fueron detectados por Western Blot. Las señales de HO-1 fueron cuantificadas y corregidas con las correspondientes señales de actina y expresadas en porcentajes respecto al control. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm error estándar de la media de 3 determinaciones (* $p < 0,05$ respecto al resto de condiciones, según el test t de Student).

3.3 EFECTO DE LA PGA₁ Y LA PGA₁-B SOBRE LOS NIVELES DE LA γ -GLUTAMIL-CISTEÍNA SINTETASA

Además de la HO-1, las cyPG inducen otros mediadores citoprotectores, como las proteínas de choque térmico y el glutatión (GSH). Puesto que se ha descrito en células leucémicas murinas L-1210 que ciertas prostaglandinas ciclopentenonas estimulan la biosíntesis de la γ -glutamyl-cisteína sintetasa (γ -GCS), enzima limitante de la síntesis de GSH (Ohno *et al.*, 1990), nos propusimos estudiar el efecto de la PGA₁ sobre los niveles de esta enzima y la posibilidad de que su análogo biotinilado reprodujera sus efectos.

Para ello, los fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados con ambos compuestos a concentraciones de 30 y 60 μ M. En este caso, no se observaron efectos similares de ambas cyPG. Tras el tratamiento con la PGA₁ a una concentración de 30 μ M, se pudo observar una leve inducción de la subunidad ligera de esta enzima (γ -GCSm). Sin embargo, la PGA₁-B no indujo la expresión de esta enzima, sino un descenso de sus niveles a concentraciones altas (Figura 14).

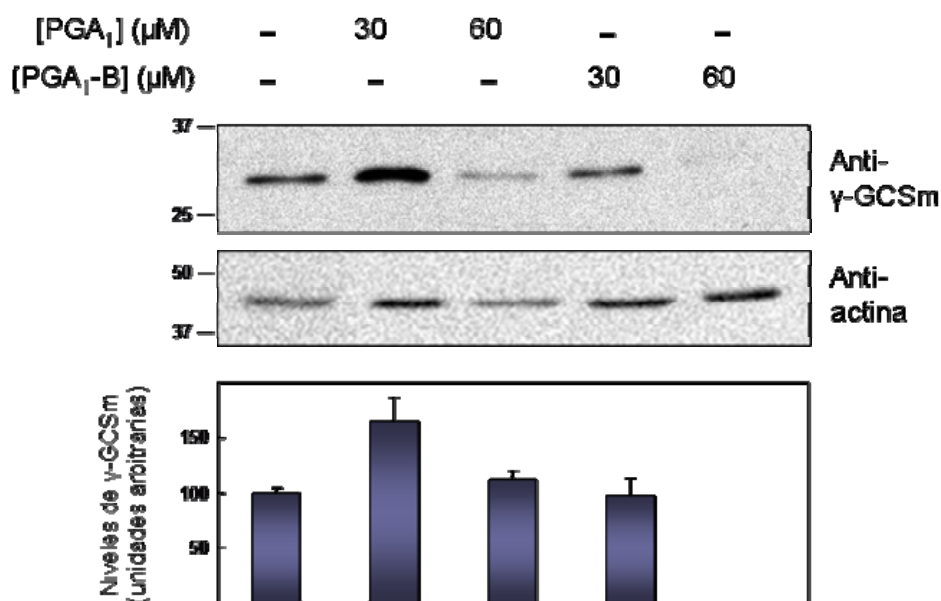


Figura 14. Efecto de PGA₁ y PGA₁-B sobre los niveles de γ -GCSm. Los fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados durante 6 horas con PGA₁ o PGA₁-B a concentraciones de 30 y 60 μ M o con un volumen equivalente de vehículo (DMSO). Los niveles de la proteína fueron detectados por Western Blot con anticuerpo anti- γ -GCSm. Las señales de γ -GCSm fueron cuantificadas y corregidas con las correspondientes señales de actina y expresadas en porcentajes con respecto al control. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 determinaciones.

4. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA PARA LA MODIFICACIÓN POR PGA₁ Y PGA₁-B

Los resultados descritos indican que la PGA₁-B reproduce muchos de los efectos biológicos de la PGA₁, y que estos efectos podrían deberse a un mecanismo independiente de PPAR γ . Por ello, las dianas de PGA₁-B identificadas mediante abordajes proteómicos son interesantes para poder desvelar los mecanismos de los efectos antiinflamatorios o antiproliferativos de esta cyPG.

Como hemos observado anteriormente, el tratamiento de fibroblastos NIH-3T3 intactos con PGA₁-B o 15d-PGJ₂-B resulta en una incorporación estable de estos prostanoides en un amplio número de polipéptidos. La figura 15 representa el abordaje experimental empleado para la identificación y posterior validación de dianas de PGA₁-B y 15d-PGJ₂-B. Los polipéptidos marcados con PGA₁-B y 15d-PGJ₂-B están presentes tanto en la fracción P100 como en fracciones S100 de lisados celulares. Mediante el enriquecimiento de proteínas modificadas por ambos análogos biotinilados por cromatografía en resina de neutravidina-agarosa seguida de SDS-PAGE y posterior análisis mediante LC-MS/MS de las bandas correspondientes a los eluidos de la resina, se identificaron diversas dianas potenciales de modificación por PGA₁-B y 15d-PGJ₂-B (Garzon *et al.*, 2010; Garzon *et al.*, 2007; Gharbi *et al.*, 2007).

La tabla 2 presenta una lista de algunas de las proteínas que habían sido identificadas por este método. Las proteínas pertenecían a diversas categorías. Varios de estos polipéptidos correspondían a proteínas de la respuesta a estrés térmico, como las subunidades α y β de la Hsp90. También se identificaron proteínas que constituyen la red de filamentos intermedios, como la vimentina o las laminas A y C. Otras proteínas de citoesqueleto identificadas fueron la actina, la α -actinina, la tubulina y la fascina además de diversas proteínas relacionadas con la síntesis de proteínas, como el factor de iniciación eucariótico 4A-I (eIF4A-I) y los factores de elongación con actividad GTPasa, tales como el factor de elongación 1 α 1 (EF-1 α 1) y el factor de elongación 2 (EF-2). También destacan enzimas implicadas en múltiples reacciones celulares como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

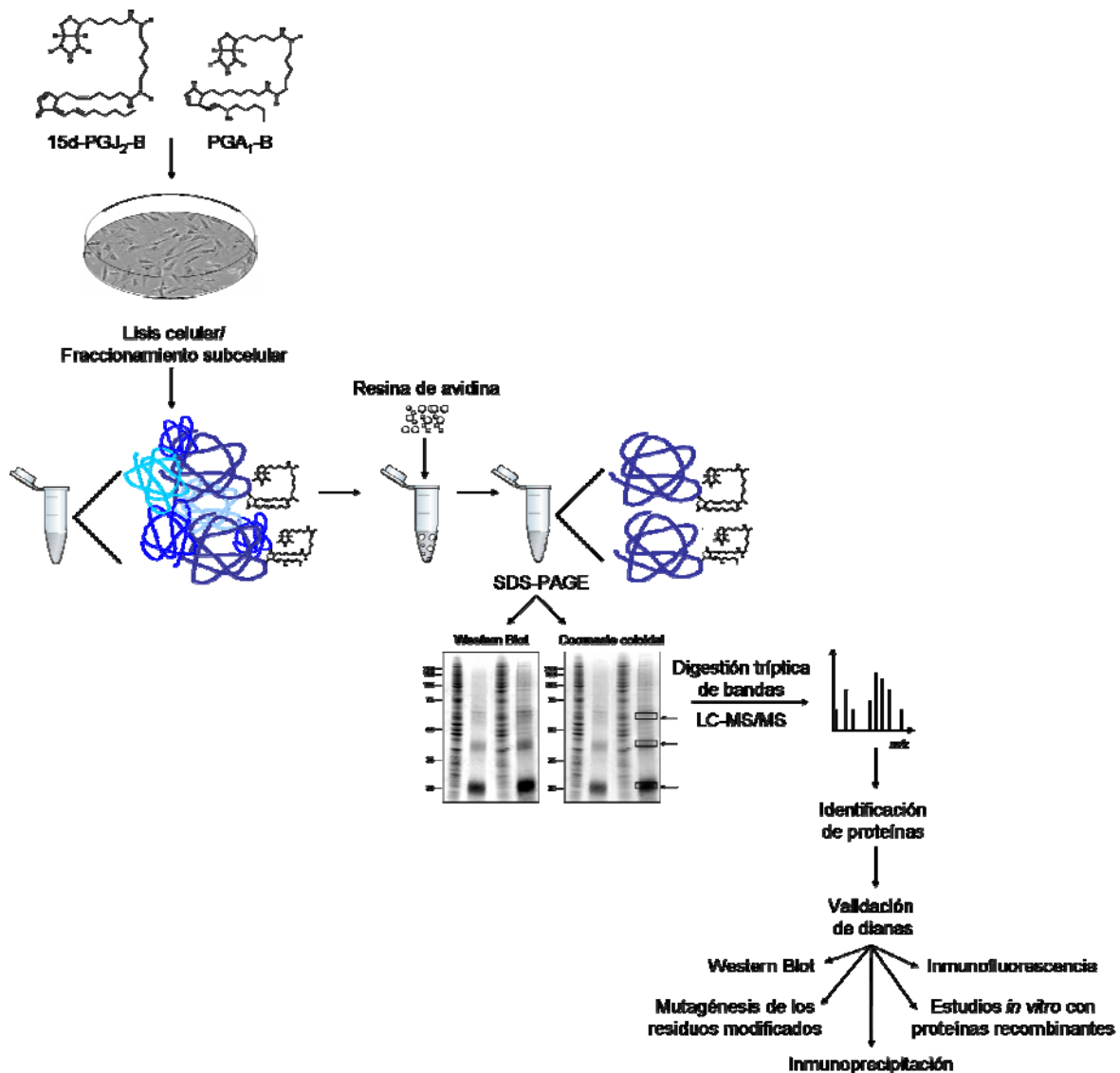


Figura 15. Diagrama de flujo del desarrollo experimental para la identificación de dianas de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B. Los fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados con las cyPG biotiniladas. Tras llevar a cabo los fraccionamientos subcelulares S100/P100, las proteínas diana se purificaron por afinidad en resina de avidina. Las proteínas eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie coloidal o Western Blot y detección de biotina mediante incubación con HRP-estreptavidina. Las bandas correspondientes a las proteínas eluidas y teñidas con Coomassie coloidal fueron digeridas con tripsina y analizadas por espectrometría de masas LC/MS-MS. Una vez identificadas, las posibles dianas se confirmaron mediante Western Blot con anticuerpos frente a las proteínas de interés, inmunoprecipitación o inmunofluorescencia con anticuerpos específicos, mediante ensayos *in vitro* con proteínas dianas recombinantes o mediante mutagénesis de los residuos implicados en la modificación.

NÚMERO DE ACCESO	PROTEÍNA IDENTIFICADA	PESO MOLECULAR
FRACCIONES S100 DE NIH-3T3 TRATADOS CON PGA₁-B		
Q02053	Enzima E1 1 activadora de ubiquitina	117734
P57780	α- actinina 4	104911
Q7TPR4	α - actinina 1	103004
O88990	α- actinina 3	102978
P58252	Factor de elongación 2	96091
P07901	Hsp90α	84604
P11499	Hsp90 β	83142
Q61553	Fascina	54240
P10126	Factor de elongación 1 α 1	50281
P09411	Fosfoglicerato kinasa 1	44776
P60710	Actina	42052
P16858	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	35941
FRACCIONES P100 DE NIH-3T3 TRATADOS CON PGA₁-B		
P08238	Hsp90 β	83081
P08670	Vimentina	53488
P14136-1	Proteína ácida fibrilar glial	49850
Q8N532	Proteína TUBA6 (tubulina α)	36997
P68104	Factor de elongación 1 α 1	50109
P60842	Factor de iniciación eucariótico 4A-I	46125
P60709	Actina	41710
FRACCIONES P100 DE NIH-3T3 TRATADOS CON 15d-PGJ₂-B		
IPI00021405	Lamina A	74095
IPI00216952	Lamina C	65096
IPI00418471	Vimentina	53488
IPI00011654	Tubulina β2	49639
IPI00396485	Factor de elongación 1 α 1	50109
IPI00025491	Factor de iniciación eucariótico 4A-I	46125
IPI00021439	Actina	41710
IPI00219018	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	35899
IPI00455315	Anexina A2	38449

Tabla 2. Proteínas identificadas mediante LC/MS-MS. Las fracciones S100 y P100 de los fibroblastos tratados con PGA₁-B o 15d-PGJ₂-B fueron purificadas mediante cromatografía en avidina-agarosa y separadas mediante SDS-PAGE. Las bandas de polipéptidos teñidos con Coomassie coloidal fueron cortadas del gel, tripsinizadas y analizadas mediante LC-MS/MS. Se muestran algunas de las proteínas identificadas en ambas fracciones tras el tratamiento con PGA₁-B o 15d-PGJ₂-B. Se muestran los números de acceso en la base de datos de Swiss-Prot y de IPI ("International Protein Index").

4.1 VALIDACIÓN DE DIANAS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS TRAS LA CROMATOGRAFÍA EN AVIDINA

Tras la identificación anteriormente descrita de diversas proteínas de la fracción S100 y P100 de NIH-3T3 como dianas potenciales para la $\text{PGA}_1\text{-B}$, llevamos a cabo diversos procedimientos para la validación del abordaje experimental y para la confirmación de proteínas diana. En primer lugar verificamos la selectividad del enriquecimiento de las proteínas biotiniladas. Realizamos una cromatografía en resina de neutravidina-agarosa de los lisados totales de los fibroblastos tratados con $\text{PGA}_1\text{-B}$ seguida de análisis mediante Western Blot con anticuerpos específicos y con HRP-estreptavidina.

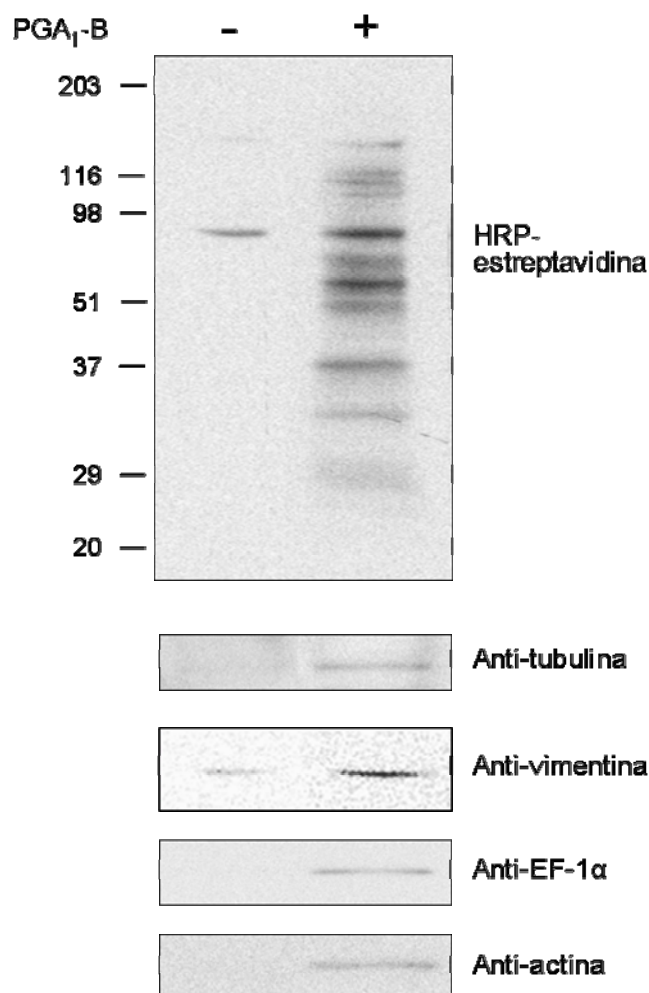


Figura 16. Análisis mediante Western Blot de los eluidos de la resina de neutravidina-agarosa. Los fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados con $\text{PGA}_1\text{-B}$ o con un volumen equivalente de DMSO durante 2 horas. Los lisados totales resultantes fueron sometidos a cromatografía en resina de neutravidina-agarosa y los eluidos obtenidos fueron analizados por Western Blot y detectados con HRP-estreptavidina o anticuerpos específicos anti-tubulina, anti-vimentina, anti-EF-1 α o anti-actina.

Como se observa en la figura 16, la retención en la avidina-agarosa de varias proteínas identificadas previamente es específica y dependiente de la presencia de la biotina. En concreto, la tubulina, la vimentina, el EF-1 α y la actina se detectaron en los eluidos de las células tratadas con PGA₁-B, de forma selectiva con respecto a las muestras control.

De la misma forma, todas las proteínas aisladas en la fracción S100 de NIH-3T3 detalladas en la tabla 2 resultaron retenidas específicamente en la resina cuando las células fueron tratadas con PGA₁-B (Garzon *et al.*, 2010). Estas proteínas pueden ser, por tanto, candidatas para la modificación por PGA₁-B y podrían estar implicadas en algunos de los efectos de las cyPG.

4.2 CONFIRMACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS MEDIANTE ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN

La retención selectiva de proteínas en la resina de avidina de las muestras de fibroblastos tratados con PGA₁-B puede deberse a que estas proteínas se encuentren modificadas covalentemente por la prostaglandina biotinilada o a que interaccionen de forma muy estrecha con otras proteínas biotiniladas en las condiciones empleadas.

Para confirmar que la retención en la resina de avidina de las proteínas se debe a su modificación directa por la prostaglandina biotinilada, llevamos a cabo en primer lugar ensayos de inmunoprecipitación con muestras de las fracciones S100 de NIH-3T3 con anticuerpos específicos contra las proteínas diana potencialmente modificadas por PGA₁-B (Figura 17).

En los inmunoprecipitados obtenidos con anticuerpos anti- α -actinina, anti-EF-1 α , anti-EF-2 y anti-GAPDH se detectó una señal de biotina que comigraba con la proteína inmunoprecipitada correspondiente. La señal se observó en las muestras tratadas con PGA₁-B pero no en las muestras control. Estos resultados sugieren que en estas cuatro proteínas se ha producido una modificación directa por PGA₁-B (Figura 17).

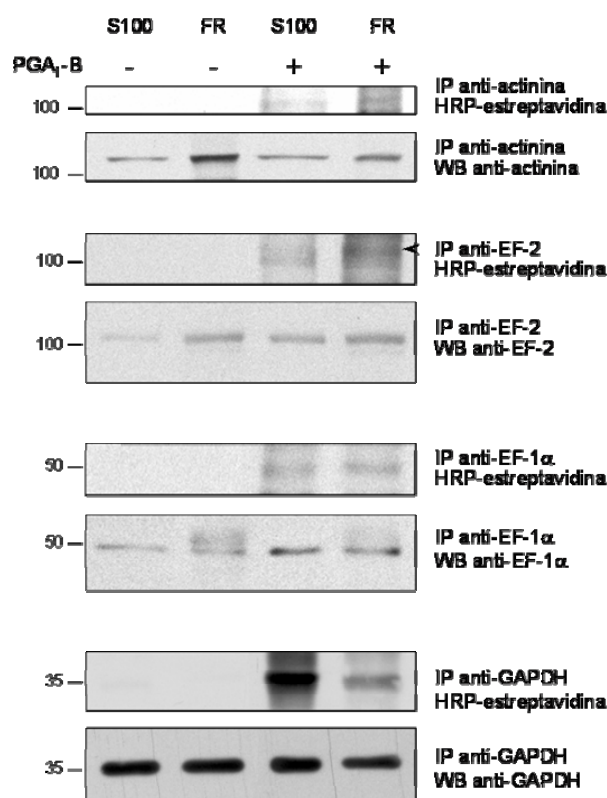


Figura 17. Ensayos de inmunoprecipitación de dianas de PGA₁-B. Las fracciones citosólicas de NIH-3T3 tratados previamente con 60 μ M PGA₁-B o un volumen equivalente de vehículo (DMSO) fueron sometidas a inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos anti-actina, anti-EF-2, anti-EF-1 α o anti-GAPDH tal y como se describe en el apartado "Materiales y métodos". Las alícuotas de las fracciones citosólicas (S100) y de las proteínas inmunoprecipitadas (FR) fueron analizadas por SDS-PAGE seguida de Western Blot. La detección de biotina se realizó mediante incubación con HRP-estreptavidina (paneles superiores) y la detección de las proteínas de interés mediante Western Blot (WB) con anticuerpos específicos (paneles inferiores).

4.3 ENSAYOS *IN VITRO* CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para completar la caracterización de dianas de PGA₁-B, llevamos a cabo ensayos *in vitro* con proteínas recombinantes tales como α -actina, Hsp90 α , actina y GAPDH. Tal y como muestra la figura 18A, se observaron diferencias en la incorporación de PGA₁-B a estas proteínas, dependiendo de la proteína en cuestión. La modificación de actina se observó con una concentración de 0,1 μ M de PGA₁-B y fue la proteína en la que se detectó una mayor incorporación de biotina a la concentración de 10 μ M de PGA₁-B. Las modificaciones de α -actina y de Hsp90 α se detectaron tras la incubación de las proteínas con PGA₁-B a una concentración de 1 μ M, mientras que la modificación de GAPDH por la prostaglandina biotinilada solo se apreció con las dosis más altas de PGA₁-B.

A continuación estudiamos si esta modificación de proteínas recombinantes por $\text{PGA}_1\text{-B}$ era competida por PGA_1 , para lo cual, incubamos cada proteína recombinante con exceso de PGA_1 seguida de incubación con $\text{PGA}_1\text{-B}$ a concentración de 1 μM . Como podemos observar en la figura 18C, en todos los casos, se observó una competición de ambos compuestos por la unión a las proteínas recombinantes de manera dependiente de la concentración, aunque de magnitud variable, dependiendo de la proteína estudiada.

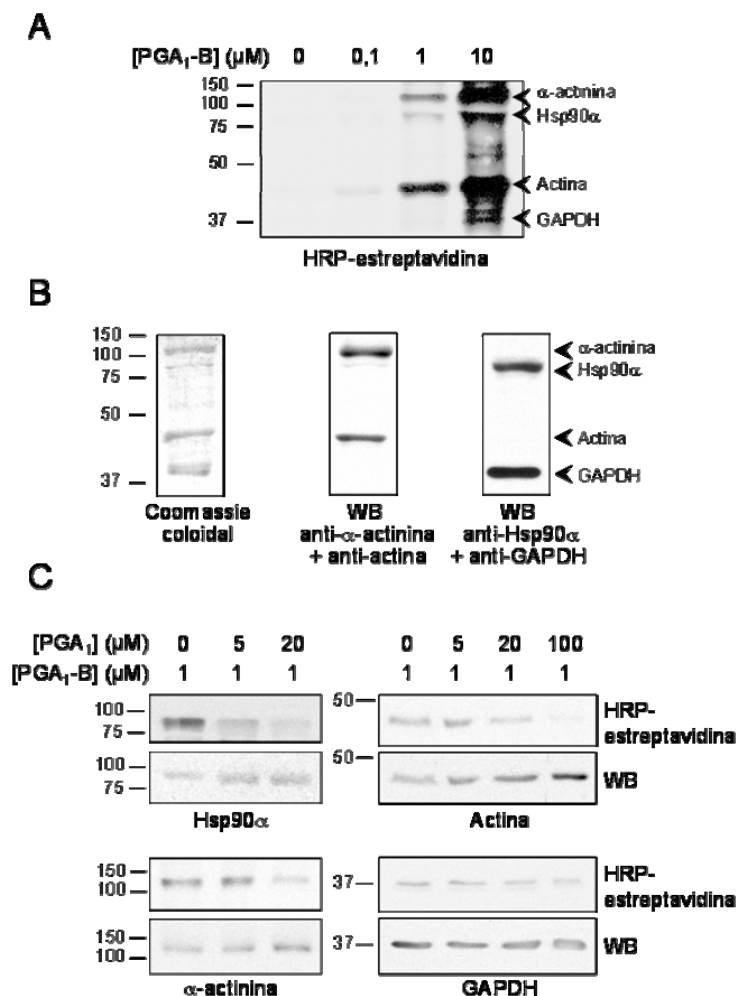


Figura 18. Modificación *in vitro* de proteínas diana por $\text{PGA}_1\text{-B}$. (A, B) Las mezclas de proteínas recombinantes compuestas de α -actinina, Hsp90 α , GAPDH y actina a concentraciones finales de cada proteína de 3 μM fueron incubadas con $\text{PGA}_1\text{-B}$ durante 1 hora a temperatura ambiente a las concentraciones indicadas o con un volumen equivalente de vehículo y después fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western Blot. La incorporación de biotina fue detectada mediante incubación con HRP-estreptavidina (A), y la detección de las proteínas de interés mediante incubación con los anticuerpos específicos y tinción con Coomassie coloidal (B). (C) Las proteínas recombinantes fueron incubadas con un exceso de PGA_1 durante 30 minutos a temperatura ambiente a las concentraciones indicadas y a continuación con $\text{PGA}_1\text{-B}$ a concentración final de 1 μM durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron procesadas por SDS-PAGE y la detección de la biotina incorporada se realizó mediante incubación con HRP-estreptavidina (paneles superiores). Las proteínas se detectaron mediante Western Blot (WB) con anticuerpos específicos (paneles inferiores) (C). Los resultados mostrados son representativos de 3 ensayos.

Siguiendo diferentes abordajes experimentales, estos ensayos confirman que diversas proteínas son modificadas por $\text{PGA}_1\text{-B}$ y que la PGA_1 compite con su análogo biotinilado por la modificación de algunas de ellas. La confirmación de estas dianas supone un punto de partida para poder explicar algunos efectos de esta prostaglandina.

5. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE LA VIMENTINA POR $\text{PGA}_1\text{-B}$

La vimentina es una proteína perteneciente a la familia de los filamentos intermedios que ha sido identificada como diana de modificación por prostaglandinas ciclopentenonas como la 15d-PGJ₂. Esta modificación se asocia con una reorganización de estos filamentos en células mesangiales de rata (RMC). Se ha demostrado que la estructura de ciclopentenona y la presencia del residuo de cisteína de la vimentina son importantes para esta reorganización de los filamentos de vimentina (Stamatakis *et al.*, 2006). Sin embargo, se desconocen muchos aspectos de la modificación de la vimentina, por lo que nos planteamos a continuación el estudio en profundidad de esta modificación.

5.1 MODIFICACIÓN DE LA VIMENTINA RECOMBINANTE *IN VITRO*

Tras confirmar que la vimentina era retenida selectivamente en la resina de avidina tras el tratamiento con $\text{PGA}_1\text{-B}$, estudiamos la modificación de esta proteína *in vitro* y posterior análisis mediante Western Blot.

En primer lugar observamos que la $\text{PGA}_1\text{-B}$ puede unirse *in vitro* a vimentina recombinante de una forma dependiente de la concentración (Figura 19A). Observamos también que la unión de $\text{PGA}_1\text{-B}$ a vimentina no varía sustancialmente con la concentración de agente reductor presente en la incubación. En nuestras condiciones experimentales, la medida de la unión fue 0,1 moles de $\text{PGA}_1\text{-B}$ por mol de vimentina aproximadamente (Figura 19B). La vimentina contiene únicamente un residuo de cisteína en la posición 328, el cual está conservado en vertebrados y constituye un sitio potencial de modificación por $\text{PGA}_1\text{-B}$. Como se observa en la figura 19C, la preincubación con iodacetamida redujo la unión de $\text{PGA}_1\text{-B}$ a la vimentina, indicando así la necesidad de grupos tioles libres para la unión de $\text{PGA}_1\text{-B}$.

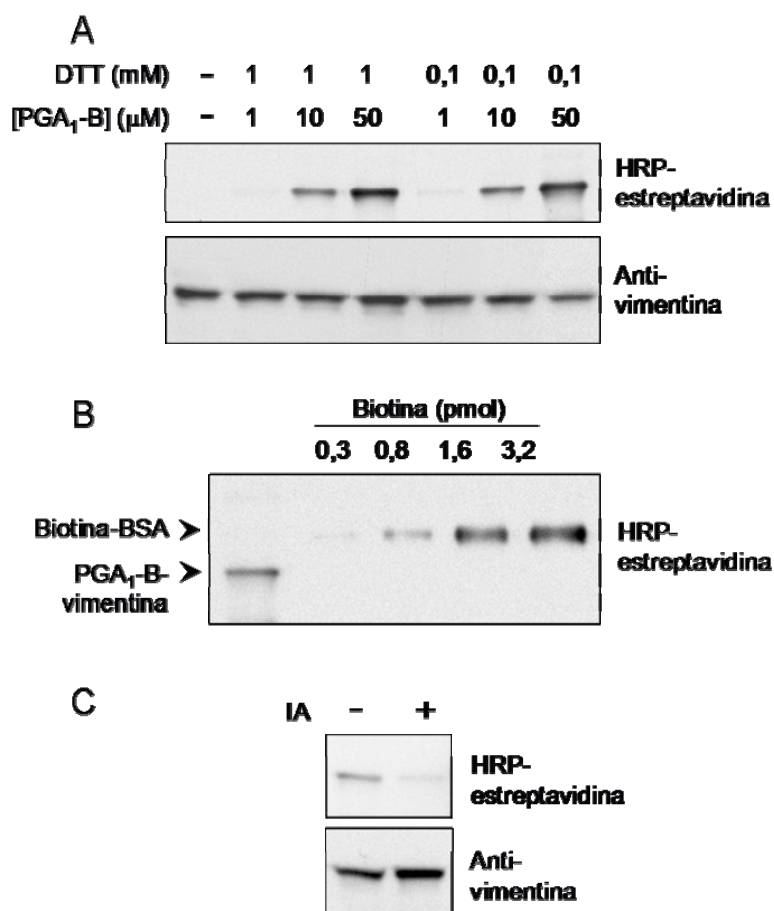


Figura 19. Modificación de vimentina recombinante *in vitro* por PGA₁-B. (A) La vimentina recombinante a una concentración final de 5 μM fue incubada con las concentraciones indicadas de DTT y PGA₁-B o volumen equivalente de vehículo durante 2 horas a temperatura ambiente. (B) La vimentina recombinante fue incubada con PGA₁-B a 50 μM durante 2 horas. Una alícuota de la incubación que contenía 0,2 pmoles de vimentina fue analizada en paralelo con alícuotas de BSA biotinilada. (C) La vimentina a concentración de 5 μM fue incubada durante 1 hora con iodacetamida (IA) 2 mM o con un volumen equivalente de vehículo y posteriormente incubada con PGA₁-B a 50 μM durante 2 horas. La incorporación de biotina fue analizada por Western Blot y posteriormente detectada con HRP-estreptavidina. Los resultados son representativos de 3 experimentos.

5.2 IDENTIFICACIÓN DEL RESIDUO DE UNIÓN COVALENTE DE PGA₁-B

Para identificar el sitio de unión covalente de PGA₁-B, la vimentina recombinante fue incubada con PGA₁ o PGA₁-B, y posteriormente sometida a digestión triptica y análisis de MS mediante MALDI-TOF (Figura 20). La huella peptídica de la vimentina control presentaba menor cantidad de péptidos de alta *m/z* si la comparamos con los patrones obtenidos para la vimentina tratada con PGA₁ o PGA₁-B, lo que podría reflejar que la modificación química puede afectar a la proteólisis enzimática llevada a cabo por la tripsina.

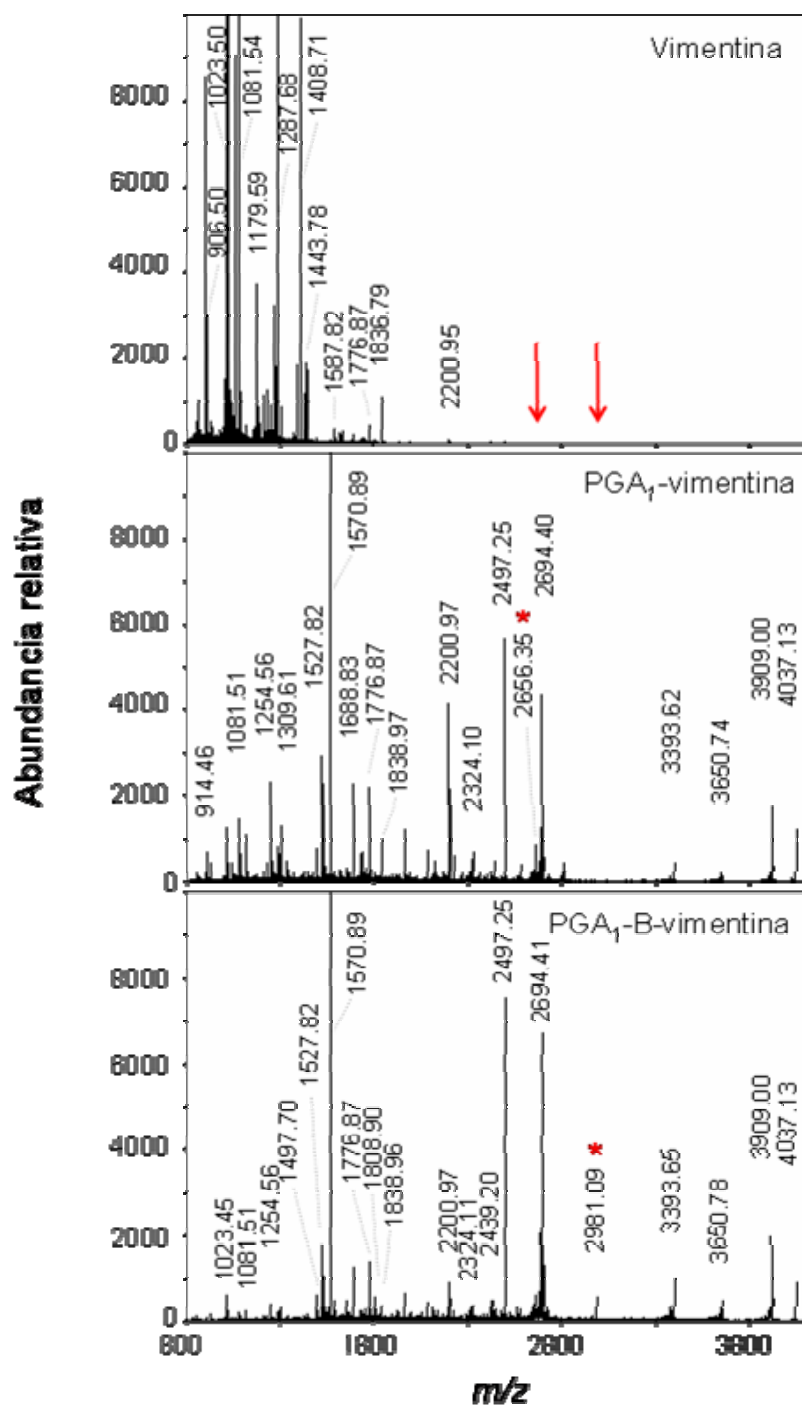


Figura 20. Análisis de MS mediante MALDI-TOF de la modificación de la vimentina por cyPG. La vimentina recombinante fue tratada con PGA₁, PGA₁-B o vehículo y sometida a digestión con tripsina. Los péptidos resultantes fueron analizados por MS mediante MALDI-TOF. Los espectros mostrados son representativos de 2 ensayos. Se muestra la posición de algunos péptidos identificados. Los péptidos marcados con asteriscos corresponden a péptidos cuyas m/z son compatibles con la adición de PGA₁ o PGA₁-B. Las posiciones de estos péptidos en la condición control se indican con flechas.

El análisis de la huella peptídica de la vimentina tratada con PGA₁ mostró la presencia de un péptido con *m/z* de 2656,35, que no estaba presente en la vimentina control y que era compatible con la adición de una molécula de PGA₁ (peso molecular 336,47) al péptido QVQSLTCEVDALKGTNESLER (residuos 321-341, *m/z* teórica de 2320,14), que contiene la cisteína 328. Además, un péptido con *m/z* de 2981,09 fue detectado únicamente en la muestra de vimentina tratada con PGA₁-B y era compatible con la adición de una molécula de PGA₁-B (peso molecular de 660,95) al péptido 321-341. Para confirmar el sitio de modificación de la vimentina por PGA₁ o PGA₁-B, los péptidos potencialmente modificados fueron sometidos a análisis de espectrometría de masas en tandem MALDI-TOF/TOF. En ambos casos, el análisis de los iones precursores correspondió a los péptidos modificados dando lugar a *iones y* y *b* compatibles con la secuencia del péptido 321-341, aunque la secuencia completa no pudo obtenerse (resultados no mostrados).

<i>m/z</i> EXPERIMENTAL			<i>m/z</i> TEÓRICO	POSICIÓN	SECUENCIA
Control	PGA ₁ -vimentina	PGA ₁ -B-vimentina			
906,5	906,46		906,46	122-128	FLEQQNK
914,49	914,46		914,45	29-36	SYVTTSTR
1023,5	1023,46	1023,45	1023,51	273-281	QQYESVAAK
1081,54	1081,51	1081,51	1081,5	313-320	QESNEYRR
1179,59			1179,56	13-23	RMFGGPGTSNR
1254,59	1254,56	1254,56	1254,56	145-154	LGDLYEEMR
1287,68	1287,66	1287,64	1287,66	159-169	QVDQLTNDKAR
1309,62	1309,61		1309,6	282-291	NLQEAEEWYK
1408,71			1408,69	310-320	QAKQESNEYRR
1443,78	1444,72		1443,76	158-169	RQVDQLTNDKAR
	1497,69	1497,7	1497,7	143-154	SRLGDLYEEMR
	1527,82	1527,82	1527,82	378-389	HLREYQDLNVK
	1570,89	1570,89	1570,89	410-423	IGLPLPNFSSLNLR
1587,82	1587,78		1587,79	100-112	TNEKVELQELNDR
1688,81	1688,83	1688,83	1688,82	170-183	VEVERDNLAEDIMR
1776,87	1776,87	1776,87	1776,86	294-309	FADLSEANRNNDALR
		1808,9	1808,89	145-158	LGDLYEEMRELRR
1836,79			1836,8	450-465	DGQVINETSQHDDLE
	1838,97	1838,96	1838,96	424-439	ETNLESPLVDTHSKR
2200,95	2200,97	2200,97	2200,98	345-363	EMEENFALEAANYQDTIGR
	2324,1	2324,11	2324,12	188-206	LQEEMLQREEAESTLQSF
	2439,19	2439,2	2439,21	100-119	TNEKVELQELNDRFANYDK
2497,18	2497,25	2497,25	2497,25	78-99	LLQDSVDFSLADINTEFKNTR
	2656,35		2320,14 (+336,5)	321-341 (+PGA₁)	QVQSLTCEVDALKGTNESLER (+PGA₁)
	2694,4	2694,41	2694,38	100-121	TNEKVELQELNDRFANYDKVR
		2981,09	2320,14 (+661,0)	321-341 (+PGA₁-B)	QVQSLTCEVDALKGTNESLER (+PGA₁-B)
	3393,82	3393,85	3393,53	188-216	LQEEMLQREEAESTLQSF RQVDNASLAR
	3650,74	3650,78	3650,77	188-216	EKLQEEMLQREEAESTLQSF RQVDNASLAR
	3909	3909	3908,89	236-269	LHDEEIQELQAQIQEQHVQI DVDVSKPDLTAALR
	4037,13	4037,13	4037,09	235-269	KLHDEEIQELQAQIQEQHVQI DVDVSKPDLTAALR

Tabla 3. Resumen de péptidos detectados por MS mediante MALDI-TOF en las muestras control, y tratadas con PGA₁ y PGA₁-B. Se muestran las *m/z* experimentales, sus masas teóricas, sus posiciones en la secuencia de la vimentina y sus respectivas secuencias.

5.3 ENRIQUECIMIENTO DE PÉPTIDOS MODIFICADOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN RESINA DE AVIDINA-AGAROSA

Para optimizar las condiciones de la identificación de los péptidos modificados llevamos a cabo el procedimiento que se describe a continuación (Figura 21).

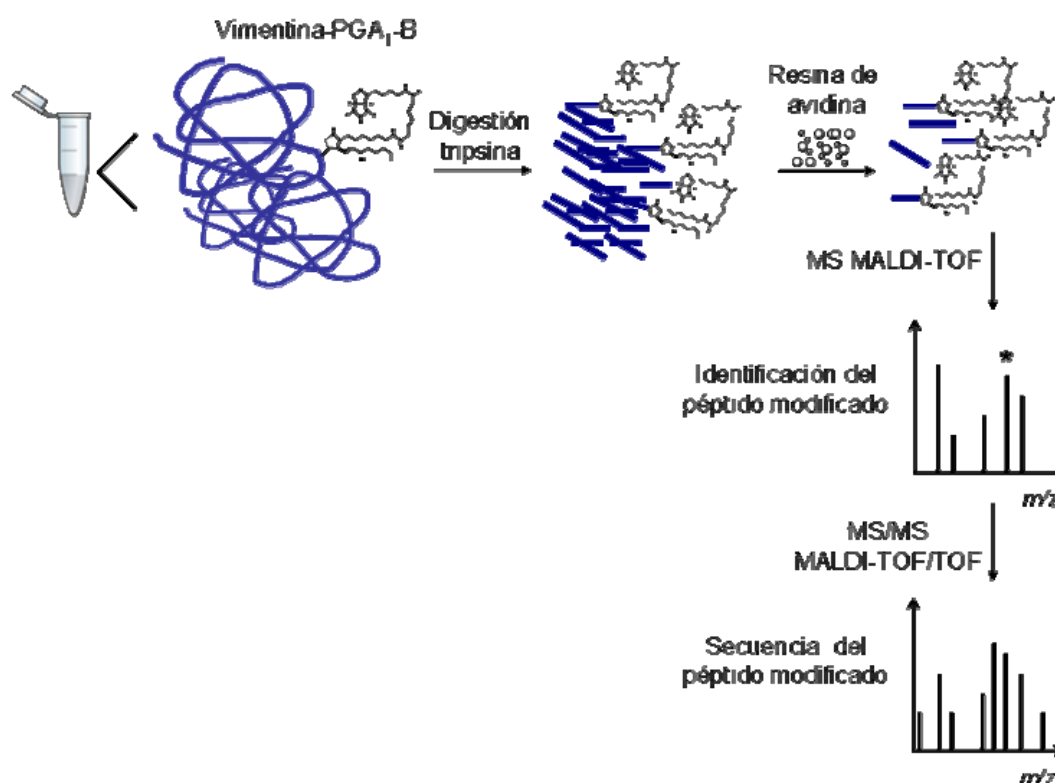


Figura 21. Diagrama de flujo del abordaje experimental para la identificación del residuo de vimentina modificado por PGA₁-B. Tras la incubación de la vimentina recombinante con PGA₁-B y posterior digestión triptica, se llevó a cabo un enriquecimiento de los péptidos modificados por la cyPG biotinilada mediante incubación con resina de avidina. Las muestras enriquecidas fueron sometidas a análisis de MS mediante MALDI-TOF, y resultó en la detección de un péptido potencialmente modificado por PGA₁-B. El análisis del péptido mediante MS/MS por MALDI-TOF/TOF permitió la identificación de la secuencia del péptido que albergaba la modificación.

Los péptidos resultantes de la digestión triptica de la vimentina modificada con PGA₁-B fueron sometidos a purificación en resina de avidina y una alícuota de la digestión fue purificada en columnas ZipTip. Tanto la digestión de partida como la eluída en la resina de avidina fueron sometidas a análisis de MS mediante MALDI-TOF. El análisis de los péptidos eluídos mostró un notable aumento en la intensidad relativa del pico de masa 2981,09 tras la purificación en avidina, indicando que este pico contiene la prostaglandina biotinilada (Figura 22).

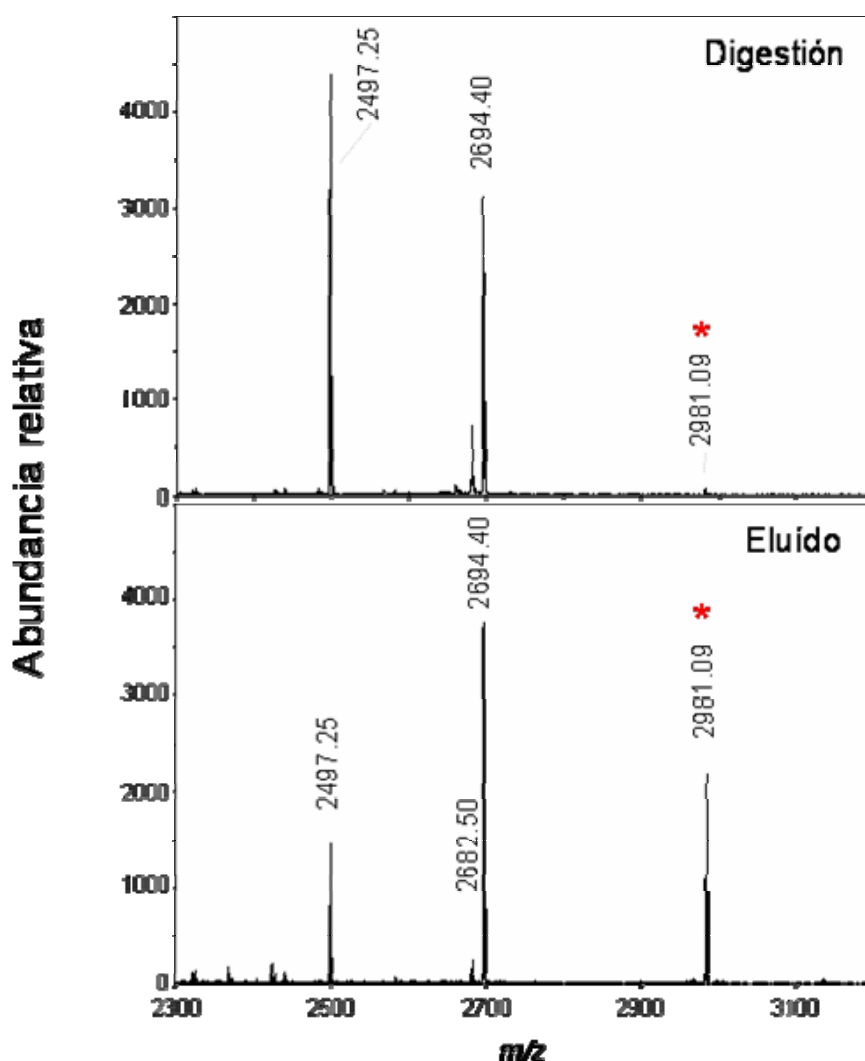


Figura 22. Espectros de masa de péptidos enriquecidos mediante cromatografía en resina de avidina-agarosa. La vimentina modificada por PGA₁-B fue digerida con tripsina. Una alícuota de la digestión una vez purificada con columnas ZipTip C18, fue analizada por MS mediante MALDI-TOF (Digestión). El resto fue sometido a incubación con resina de avidina SoftLink, eluido con ácido acético al 10% y analizado por MS mediante MALDI-TOF (Eluido). El péptido enriquecido se indica con un asterisco.

El análisis mediante MS/MS de este péptido enriquecido dio como resultado la secuencia esperada para el péptido 321-341 y un incremento de masa compatible con la adición de PGA₁-B fue observada en los iones y_{21} , $y_{21}-NH_3$ e y_{15} (marcados con asteriscos, figura 23). Estos resultados confirmaron la identidad del péptido modificado y la presencia de la modificación.

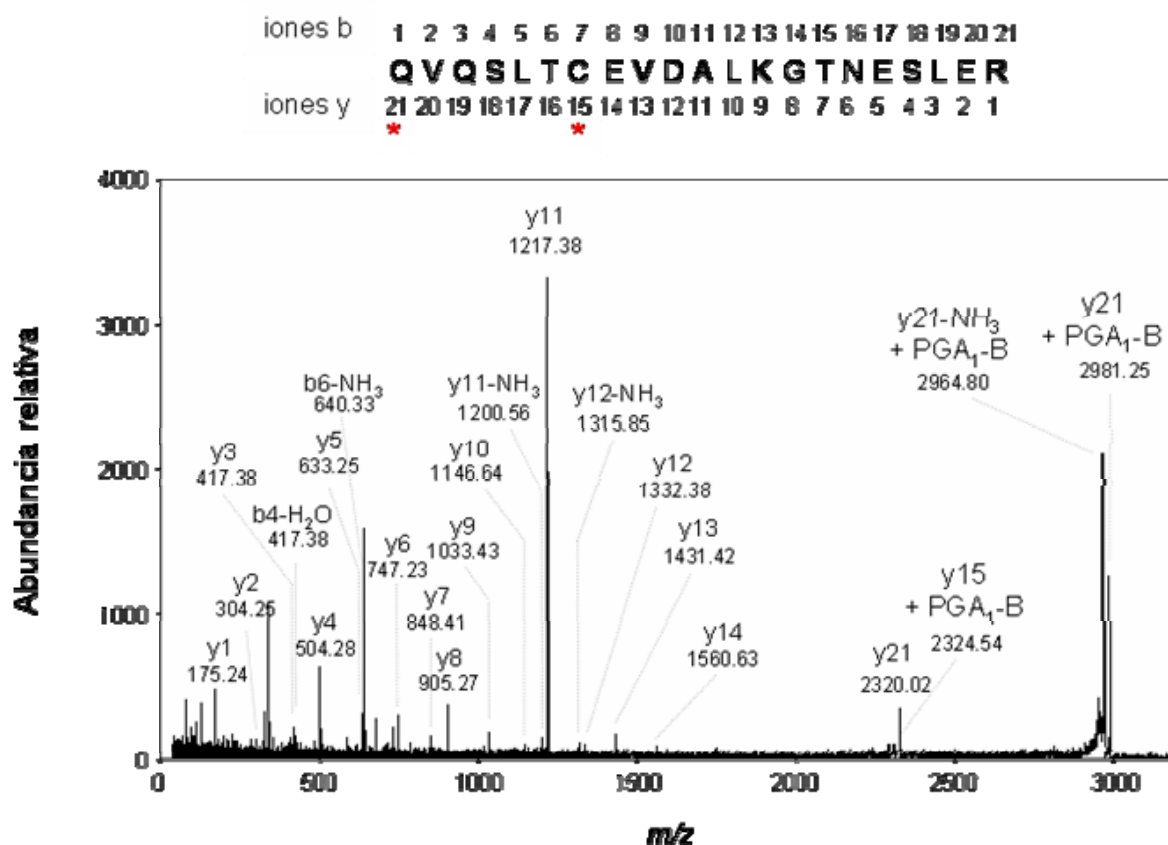


Figura 23. Análisis de MS/MS mediante MALDI-TOF/TOF del péptido potencialmente modificado por PGA₁-B. El péptido de m/z 2981,09 proveniente de la cromatografía en avidina de la digestión trípica de la vimentina modificada por la PGA₁-B fue analizado mediante MS/MS por MALDI-TOF/TOF. Se indican los valores de m/z de los iones y la secuencia del péptido obtenida. Los asteriscos marcan los péptidos que presentan un incremento compatible con la incorporación de la molécula de PGA₁-B.

5.4 CONFIRMACIÓN DE LA UNIÓN DE PGA₁-B AL RESIDUO DE CISTEÍNA 328 DE LA VIMENTINA EN CÉLULAS INTACTAS

En conjunto, nuestras observaciones indican que la PGA₁ se une al residuo de cisteína 328 de la vimentina. Para poder demostrar la importancia de este residuo para la modificación de vimentina en células intactas, células COS-7 fueron transfectadas transitoriamente con GFP-vimentina humana silvestre (WT) o mutante C328S y fueron cultivadas en presencia de PGA₁-B. Los resultados de la figura 24 muestran que la proteína GFP-vimentina WT quedaba retenida en la resina de avidina, y que la sustitución de la cisteína 328 por serina reducía drásticamente la retención de GFP-vimentina en la resina. Estos resultados indican que la cisteína 328 es importante para la unión de PGA₁-B a la vimentina en células intactas.

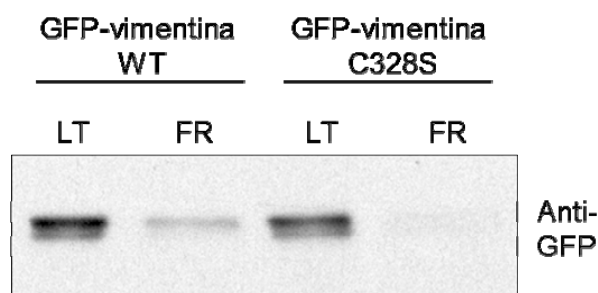


Figura 24. Modificación del residuo C328 de la vimentina en células intactas. Células COS-7 fueron transfectadas con GFP-vimentina WT o mutante C328S y tratadas con $\text{PGA}_1\text{-B}$ durante 2 horas a 37°C . Los lisados celulares totales fueron sometidos a cromatografía en neutravidina-agarosa. Los lisados totales (LT) y eluidos (FR) fueron analizados por electroforesis y Western Blot con anticuerpo anti-GFP para confirmar la presencia de GFP-vimentina. Los resultados mostrados son representativos de 3 ensayos.

5.5 ESTUDIO DE LA IMPORTANCIA FUNCIONAL DEL RESIDUO DE CISTEÍNA 328 DE LA VIMENTINA EN CÉLULAS INTACTAS

Nuestro siguiente objetivo consistió en el estudio de la repercusión funcional derivada de la mutación del residuo único de cisteína de la vimentina. Resultados previos del laboratorio obtenidos en RMC mostraron que la 15d-PGJ_2 inducía un colapso de los filamentos de vimentina, mientras que en RMC transfectadas con GFP-vimentina C328S, se observaba una protección parcial frente a este colapso (Stamatakis *et al.*, 2006). Sin embargo, puesto que las RMC expresan vimentina, nos interesó el estudio de la importancia del residuo de cisteína de la vimentina en un modelo celular que no presentara una red de vimentina endógena.

Las células SW13 cl.2 se establecieron a partir de clones celulares de glándula adrenal humana que no sintetizan vimentina y que no contienen ningún sistema citoplasmático detectable de filamentos intermedios (Sarria *et al.*, 1994). Valiéndonos de las células SW-13 cl.2 humanas deficientes en vimentina, nos propusimos obtener líneas celulares estables mediante transfección con GFP-vimentina humana WT, o con el mutante C328S. El establecimiento de estas líneas celulares nos podría proporcionar información sobre la organización de los filamentos intermedios y la importancia de la cisteína en posición 328 así como de su modificación por prostaglandinas. La observación de estas células transfectadas al microscopio confocal mostró diferencias en cuanto a la disposición de los filamentos de vimentina (Figura 25).

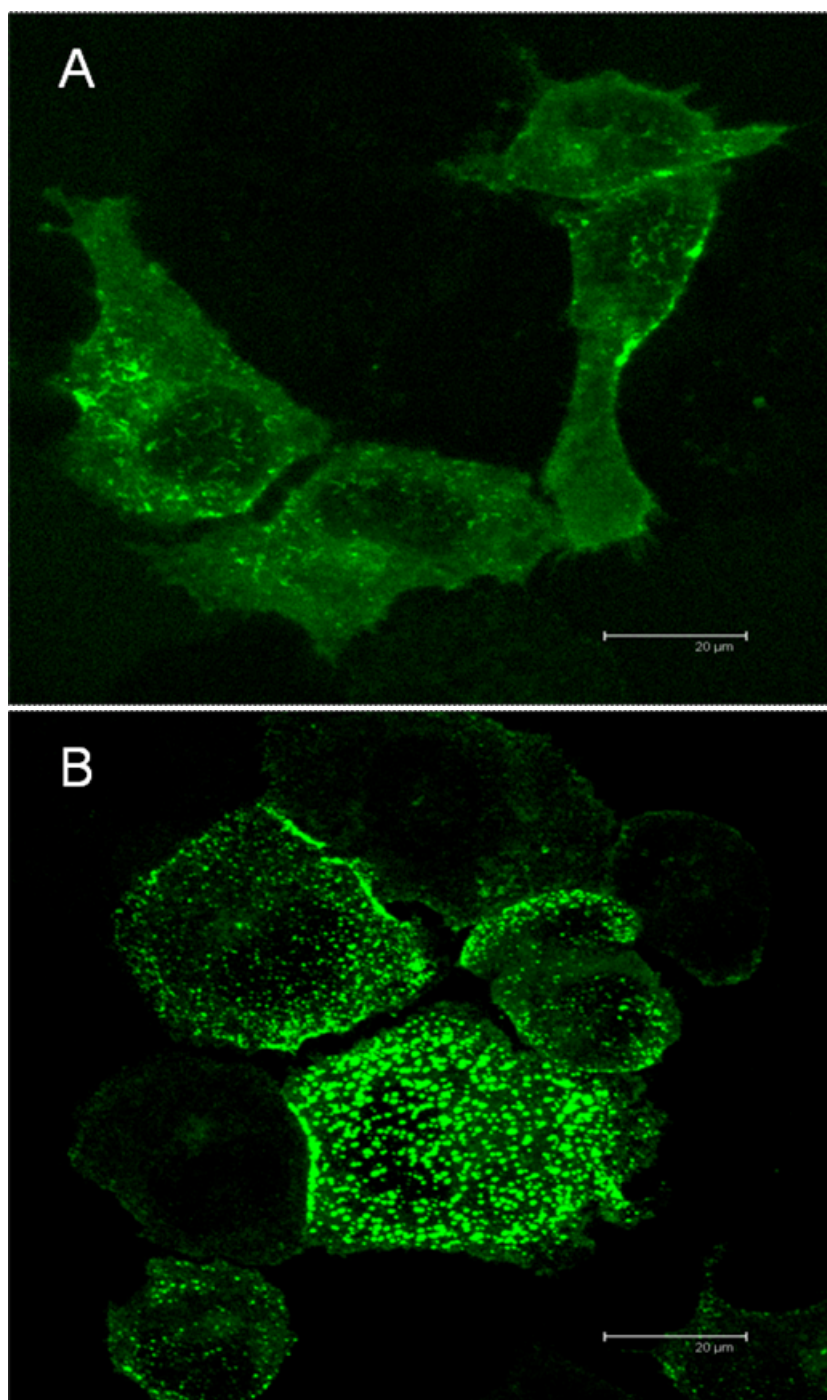


Figura 25. Distribución celular de las proteínas GFP-vimentina WT y GFP-vimentina C328S. Las células SW13 cl.2 fueron transfectadas con los plásmidos de GFP-vimentina WT (A) o mutante C328S (B) y cultivadas durante 10 días en presencia de 0,8 mg/ml de geneticina. Para su observación al microscopio confocal fueron fijadas con paraformaldehído al 4%. Las imágenes mostradas corresponden a proyecciones totales y la barra representa 20 µm.

En el caso de las células transfectadas con GFP-vimentina WT se observó una señal de fluorescencia distribuida uniformemente por el citoplasma, y la presencia de estructuras cortas filamentosas localizadas en determinadas regiones del citoplasma, que se asemejan a las estructuras descritas por otros grupos bajo el término de “squiggles” (Ho *et al.*, 1998; Yoon *et al.*, 1998). Cabe destacar que los bordes de la membrana plasmática eran irregulares pudiéndose observar pequeñas fibrillas de vimentina, similares a las descritas por otros grupos (Yoon *et al.*, 1998). Sin embargo, en las células transfectadas con GFP-vimentina C328S, se observaron múltiples señales de fluorescencia puntiformes distribuidas por la célula uniformemente, destacando la ausencia de señal difusa observada en las células transfectadas con GFP-vimentina WT. Los bordes de las membranas plasmáticas presentaban un aspecto más regular. Estos resultados sugieren que la presencia de la cisteína en posición 328 es importante para la organización de los filamentos de vimentina.

Sin embargo, a pesar de tratarse de células transfectantes estables, no se observó la formación de filamentos completos de vimentina, tal y como está descrito en otras líneas celulares (Sarria *et al.*, 1990). Para descartar que esta ausencia de filamentos de vimentina pudiera deberse a impedimentos producidos por la presencia de GFP, nos propusimos a continuación transfectar las células SW13 cl.2 con construcciones de vimentina WT y mutante C328S, en el vector de expresión pCMV6-XL5, libre de etiquetas, y detectar la expresión de la vimentina WT y C328S mediante inmunofluorescencia.

Tal y como reflejan las imágenes del microscopio confocal de la figura 26, observamos que en las células SW13 cl.2 transfectadas con el plásmido pCMV6-XL5-vimentina WT podían detectarse filamentos de vimentina, aunque cabe destacar que la eficiencia de transfección fue baja, y que la disposición de los filamentos se centraba en una disposición perinuclear. En cambio, en el caso de las células transfectadas con el plásmido pCMV6-XL5-vimentina C328S, la señal de vimentina mostró un patrón puntiforme distribuido uniformemente por el citoplasma, confirmando la hipótesis de que el residuo de cisteína en la posición 328 es importante para el ensamblaje de los filamentos en este modelo experimental.

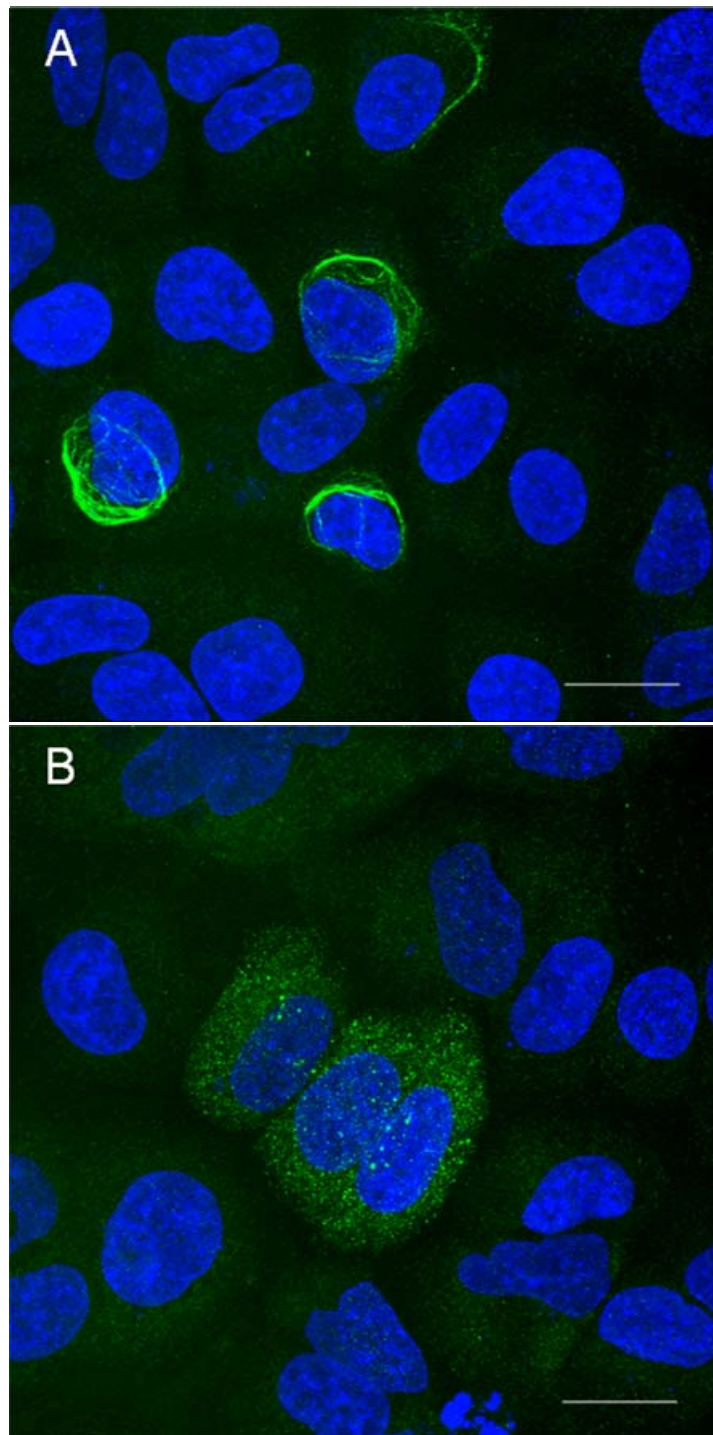


Figura 26. Distribución celular de las proteínas vimentina WT y vimentina C328S. Las células SW13 cl.2 fueron transfectadas transitoriamente durante 5 horas con los plásmidos de pCMV6 XL-5-vimentina WT (A) y mutante C328S (B). Tras 48 horas de expresión, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y se llevó a cabo un protocolo de inmunofluorescencia para la detección de la expresión de la vimentina WT y C328S con un anticuerpo primario anti-vimentina y secundario acoplado a A488 (verde). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes mostradas fueron captadas en el microscopio confocal y corresponden a las proyecciones totales. La barra representa 20 μm.

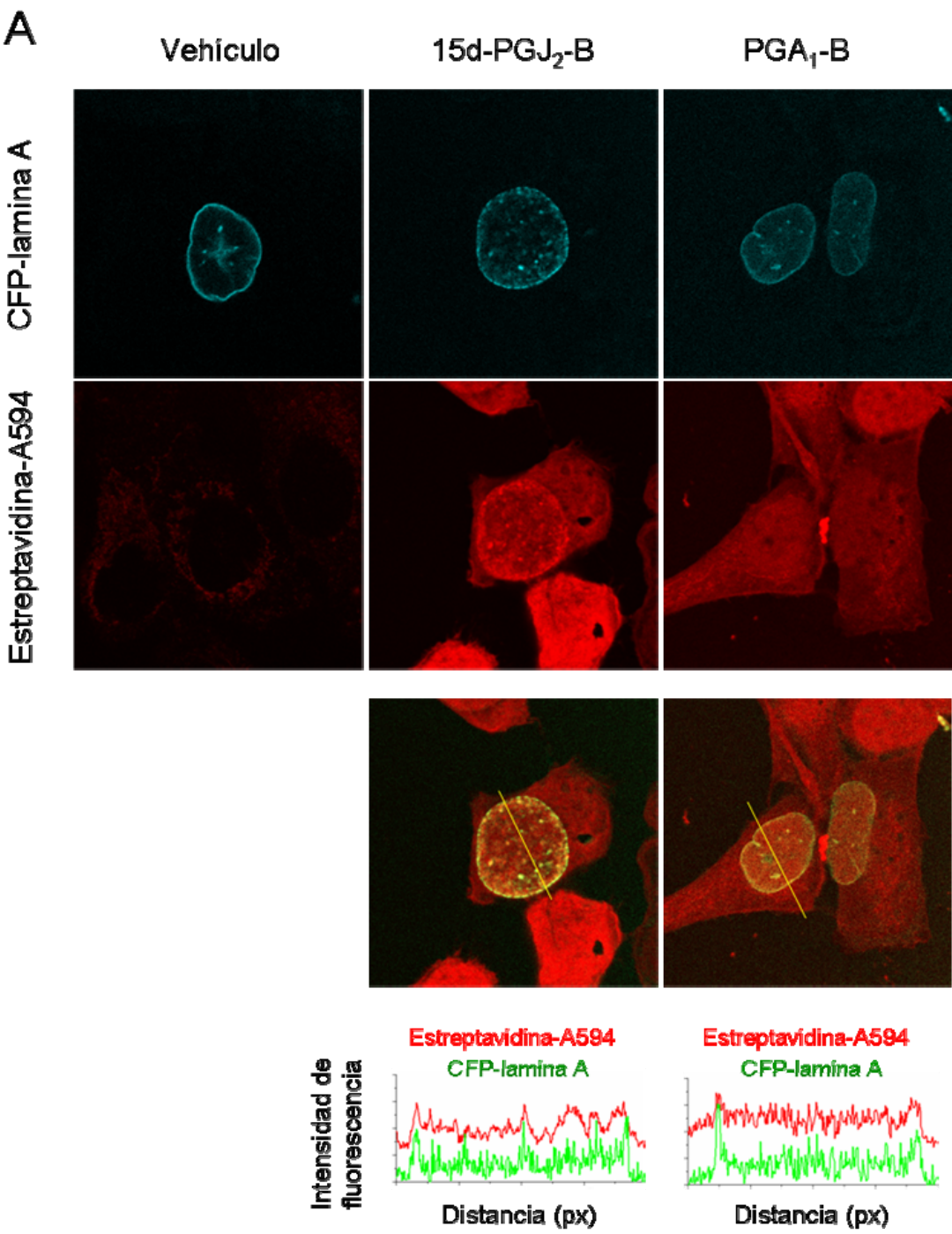
6. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE LAS LAMINAS A Y C POR cyPG BIOTINILADAS

Resultados previos de nuestro laboratorio identificaron a las laminas A y C como potenciales dianas para la modificación por 15d-PGJ₂-B, tal y como mostraron los análisis de espectrometría de masas mediante LC-MS/MS de las fracciones de membrana de fibroblastos NIH-3T3 tratados con esta cyPG biotinilada (Tabla 2) (Garzon *et al.*, 2007). Nos propusimos a continuación validar y caracterizar dicha modificación siguiendo diversos abordajes experimentales. Parte de los ensayos mostrados se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Vicente Andrés (IBV, CSIC).

6.1 COLOCALIZACIÓN DE LAS LAMINAS Y PROTEÍNAS MODIFICADAS POR LAS cyPG EN LA ENVUELTA NUCLEAR

Con estos antecedentes, nos propusimos explorar la presencia de proteínas modificadas por la 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en la envuelta nuclear. Para ello, se realizaron experimentos de microscopía confocal en varios tipos celulares.

En primer lugar, las células U2OS transfectadas con CFP-lamina A humana y tratadas posteriormente con las prostaglandinas biotiniladas o un volumen equivalente de vehículo en las condiciones control, fueron sometidas a protocolos de extracción *in situ*. Con este protocolo pudimos aislar la matriz nuclear y se eliminaron las proteínas solubles celulares, así como las proteínas de citoesqueleto y cromatina que no estaban unidas a los filamentos intermedios que componen la matriz nuclear (Fey *et al.*, 1984). Tal y como refleja la figura 27, las células tratadas con vehículo muestran la señal de las proteínas biotiniladas endógenas, cuya distribución es citoplasmática. Esta señal desaparece cuando las células son sometidas al protocolo de extracción *in situ* (Figura 27B). Se puede apreciar también que en la periferia del núcleo se detecta la señal de CFP-lamina A transfectada, y la señal de proteínas biotiniladas tras los tratamientos con ambas cyPG, de tal forma que al superponer las imágenes correspondientes, se observa una colocalización de ambas señales ilustrada en los perfiles de los paneles inferiores.



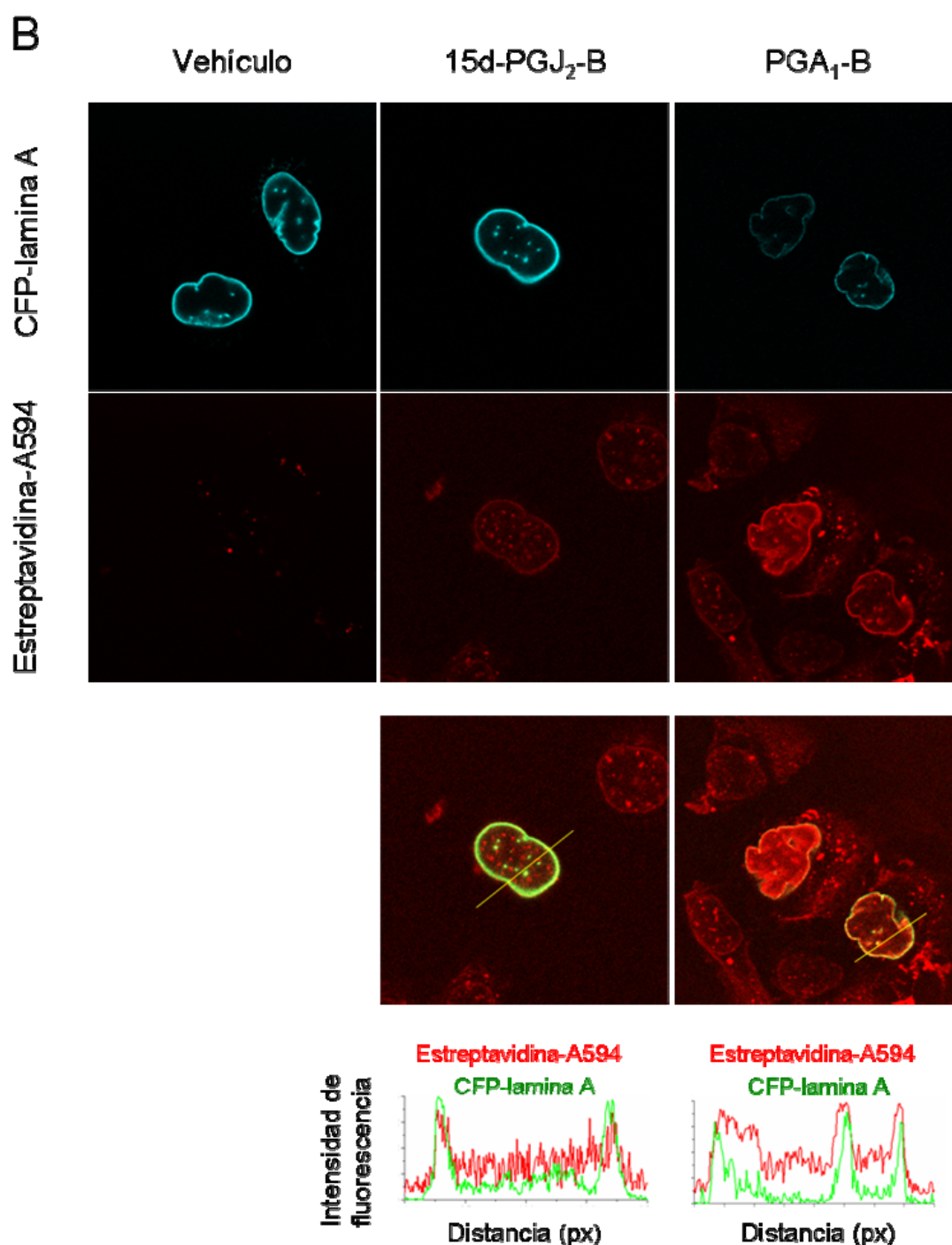


Figura 27. Estudio de la localización celular de CFP-lamina A y proteínas modificadas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B. Las células U2OS fueron transfectadas con CFP-lamina A y tratadas durante 2 horas con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B a concentraciones de 7 y 30 μ M respectivamente. Posteriormente las células fueron sometidas a extracción *in situ* de la matriz nuclear tal y como se describe en el apartado de “Materiales y métodos”. Las células fueron permeabilizadas e incubadas con estreptavidina-A594 (rojo). Los resultados muestran las imágenes obtenidas tras la observación en el microscopio confocal de células antes (A, página anterior) y después (B) de la extracción y los perfiles de colocalización de las señales correspondientes a CFP-lamina A y estreptavidina-A594 en las regiones celulares marcadas. Para la realización de dichos perfiles, la fluorescencia azul (CFP-lamina A) se ha representado en color verde.

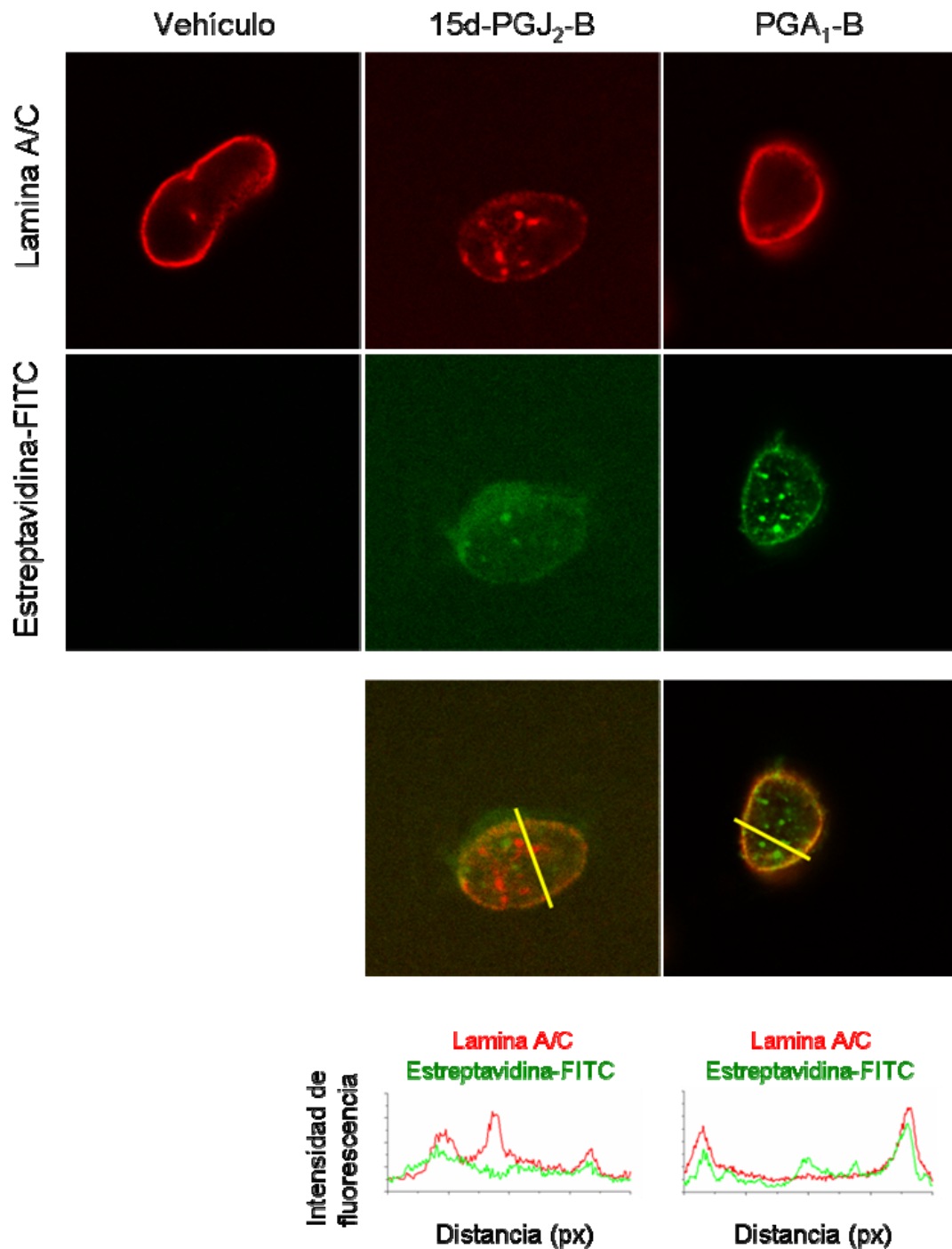
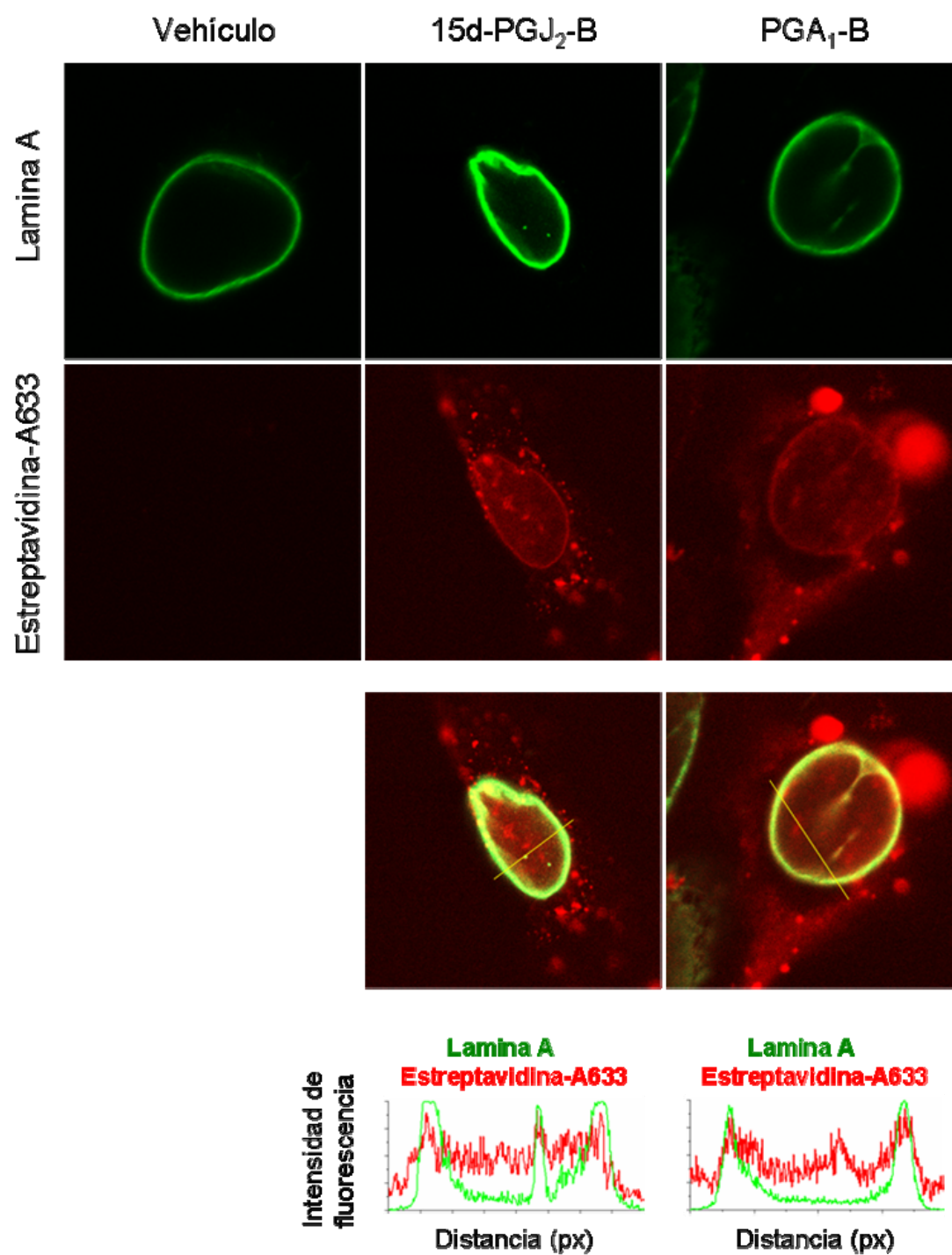


Figura 28. Localización de las laminas A y C endógenas y proteínas modificadas por las cyPG biotiniladas en la envuelta nuclear. Las células U2OS fueron tratadas durante 2 horas con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B a concentraciones de 7 y 30 μ M respectivamente o con un volumen equivalente de vehículo y sometidas a extracción *in situ* de la matriz nuclear. Las células se sometieron a inmunofluorescencia con anticuerpo anti-lamina A/C y anticuerpo secundario acoplado a A633 (rojo), y fueron incubadas simultáneamente con estreptavidina acoplada a FITC (verde). Se muestran imágenes del microscopio confocal y de los perfiles de colocalización de las señales de las laminas A y C marcadas con A633 y de estreptavidina-FITC en las regiones celulares señaladas.

El siguiente abordaje fue estudiar la colocación de las laminas A y C endógenas de las células U2OS con las proteínas modificadas por las prostaglandinas biotiniladas. Para ello, tras los tratamientos de las células con los compuestos biotinilados, fueron sometidas a extracción *in situ* y a inmunofluorescencia. Como puede observarse en la figura 28, las proteínas modificadas por las prostaglandinas biotiniladas colocan con las laminas A y C endógenas, y su localización mayoritaria es en la periferia del núcleo, como reflejan las imágenes. Estos resultados indican que las cyPG biotiniladas modifican proteínas localizadas en la envuelta nuclear, cuya distribución es similar a la observada en el caso de las laminas A y C endógenas y en el caso de la lamina A humana acoplada a CFP transfectada transitoriamente.

Una vez observada esta colocación en las células U2OS, nos propusimos a continuación estudiar la posible contribución de laminas modificadas a la señal de biotina asociada con la envuelta nuclear. Para ello, utilizamos las células MEFs *LMNA* KO, fibroblastos de origen embrionario procedentes de ratones deficientes en laminas A y C, así como células MEFs *LMNA* WT (no deficientes). Tras los tratamientos de ambas líneas celulares con 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B, y las correspondientes extracciones *in situ* e inmunofluorescencias, observamos que, como era de esperar, únicamente en las células MEFs *LMNA* WT se detectaba la colocación de la lamina A con la señal de proteínas biotiniladas por ambos compuestos (Figura 29).

A



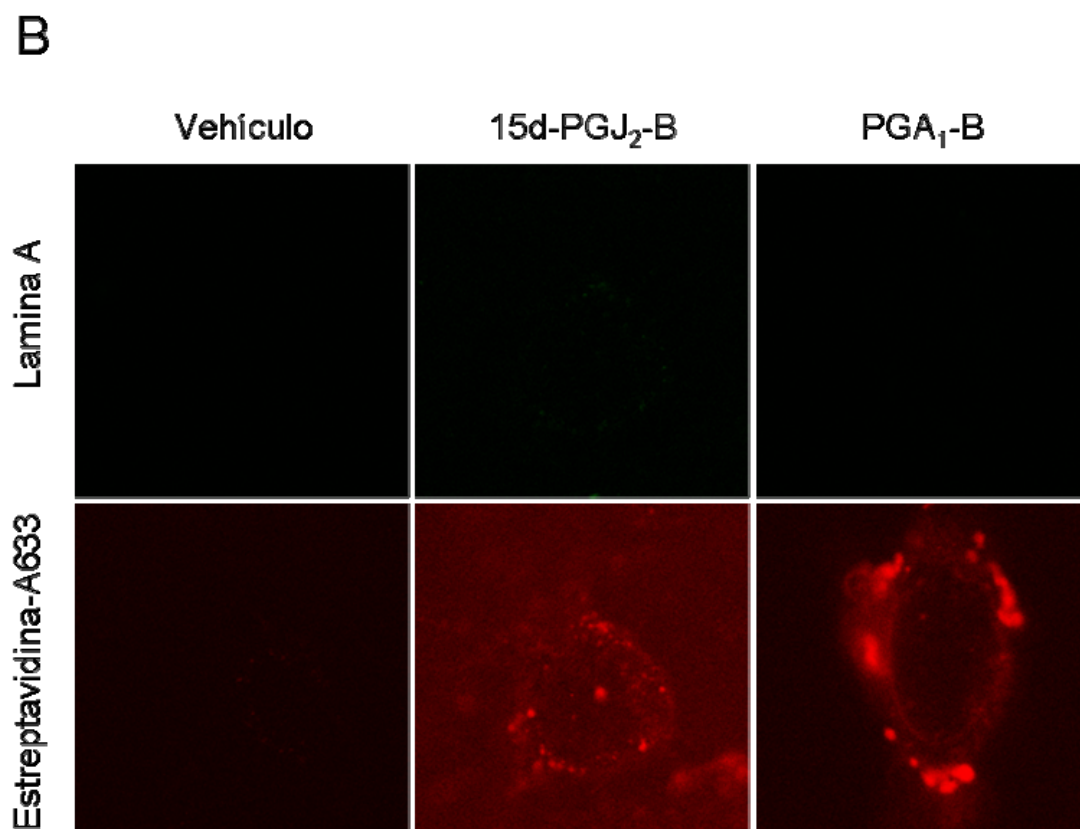
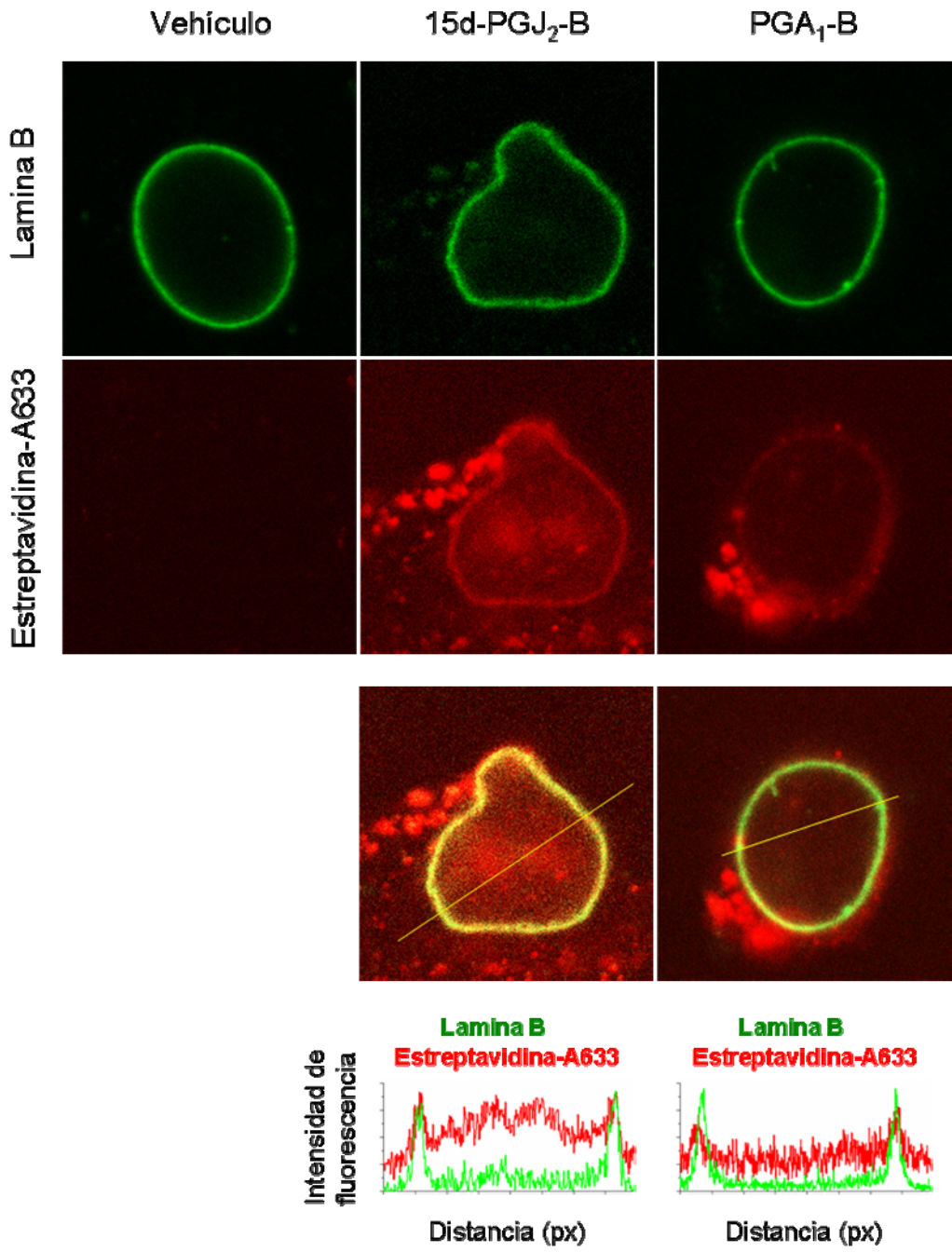


Figura 29. Localización nuclear de la lamina A y proteínas modificadas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en células MEFs LMNA WT y KO. Las células MEFs LMNA WT y KO fueron tratadas con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B a concentraciones de 7 y 30 μ M respectivamente o volumen equivalente de vehículo durante 2 horas y sometidas al protocolo de extracción *in situ*. Se llevaron a cabo inmunofluorescencias con el anticuerpo anti-lamina A seguido de incubación con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde) y con estreptavidina-A633 (rojo). Las imágenes captadas en el microscopio confocal corresponden a células LMNA WT (A, página anterior) y KO (B), así como los perfiles de colocalización en las regiones marcadas de las señales de la lamina A marcada con FITC y de la estreptavidina-A633 en las células MEFs LMNA WT (A, página anterior).

Para comprobar que estos resultados en las células MEFs LMNA KO no eran debidos a una extracción *in situ* o inmunofluorescencia deficientes, se realizó una inmunofluorescencia para detectar la proteína lamina B, que se localiza también en la periferia nuclear y sirve por tanto de marcador de la envuelta nuclear (Broers *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2008). Observamos un patrón de colocalización de lamina B con las proteínas modificadas por ambas prostaglandinas biotiniladas tanto en células MEFs LMNA KO como MEFs LMNA WT (Figura 30). Estos resultados indican que la eliminación de laminas tipo A no suprime la localización de las cyPG biotiniladas en la envuelta nuclear, lo que podría deberse a la existencia de otras dianas proteicas o a una localización preferente de las cyPG en este compartimento.

A



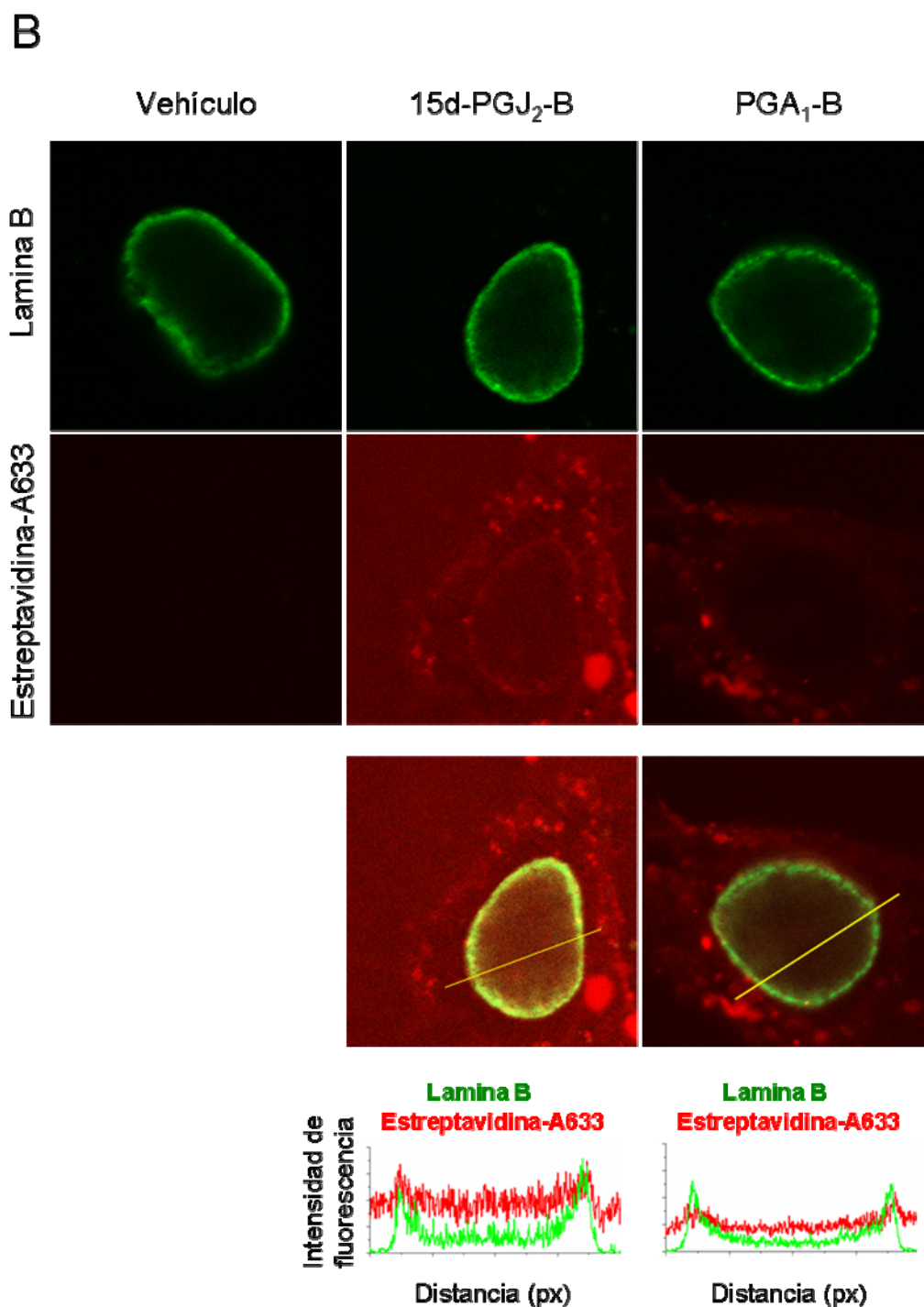


Figura 30. Localización de la lamina B y proteínas modificadas por las cyPG biotiniladas en células MEFs *LMNA* WT y KO en la periferia del núcleo. Se trataron las células MEFs *LMNA* WT y KO con 15d-PGJ₂-B a concentración de 7 μ M, con PGA₁-B a concentración de 30 μ M o con un volumen equivalente de vehículo durante 2 horas y a continuación fueron sometidas a extracción *in situ* de la matriz nuclear. Se realizaron inmunofluorescencias con el anticuerpo anti-lamina B y un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde), simultáneamente con la incubación con estreptavidina-A633 (rojo). Las imágenes mostradas corresponden a las observaciones al microscopio confocal de las células MEFs *LMNA* WT (A, página anterior) y KO (B). Se muestran los perfiles de colocación de las señales correspondientes a la lamina B marcada con FITC y la estreptavidina-A633 en las regiones celulares marcadas.

6.2 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS LAMINAS A Y C Y DE LAS PROTEÍNAS MODIFICADAS POR LAS cyPG BIOTINILADAS

Nos planteamos a continuación ensayos de fraccionamientos subcelulares que nos permitieran aislar secuencialmente tres fracciones de proteínas celulares, y por tanto, estudiar mediante Western Blot la distribución subcelular de las proteínas modificadas por las cyPG y de las laminas A y C.

Para ello, las células U2OS fueron tratadas con dichos compuestos y sometidas al protocolo de fraccionamiento subcelular, en el que se aislaron las fracciones citosólica soluble, la nuclear soluble y la nuclear resistente a la extracción (Figura 31).

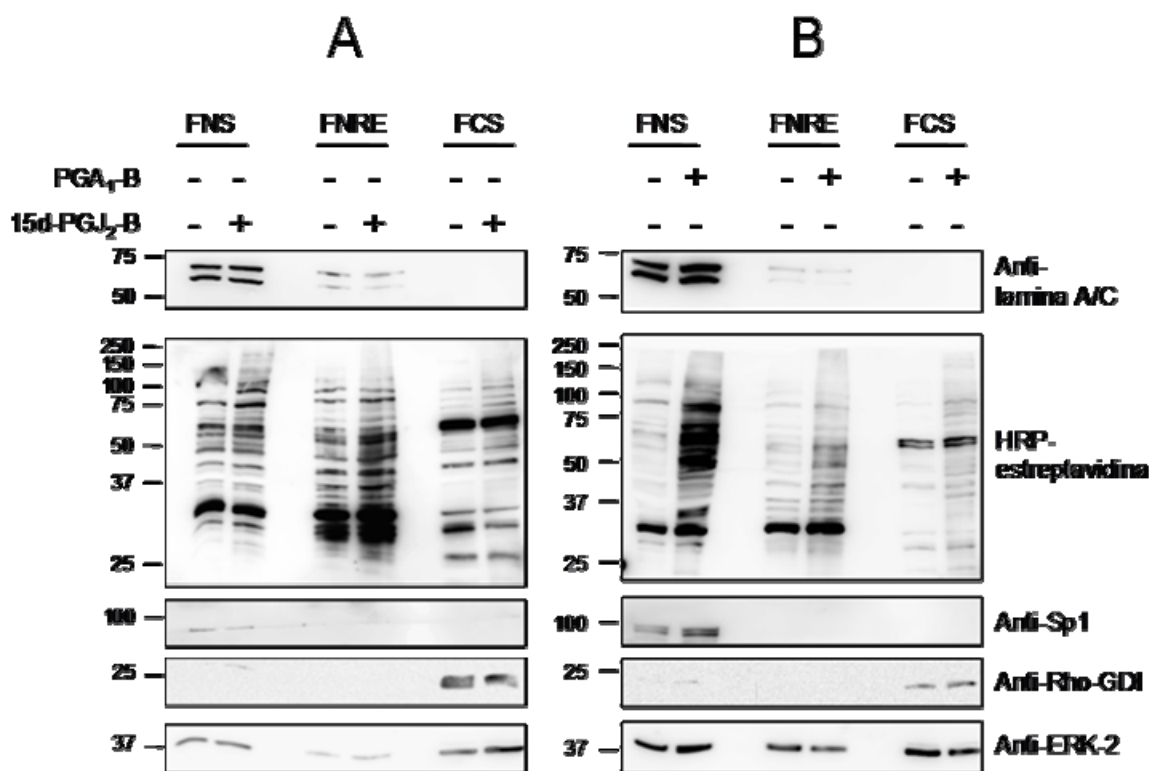


Figura 31. Estudio de la distribución subcelular de las laminas tipo A y proteínas modificadas por cyPG biotiniladas en células U2OS. Las células U2OS fueron tratadas con 15d-PGJ₂-B (A) o PGA₁-B (B) a concentraciones de 7 y 30 μ M respectivamente o con un volumen equivalente de vehículo durante 2 horas. Las células se sometieron a fraccionamiento subcelular tal y como está descrito anteriormente en el apartado de “Materiales y métodos”, y las muestras correspondientes a 75 μ g de proteína de la fracción nuclear soluble (FNS), la totalidad de la fracción nuclear resistente a la extracción resultante (FNRE) y 75 μ g de proteína de la citosólica soluble (FCS), fueron procesadas mediante Western Blot. La detección de biotina se llevó a cabo mediante incubación con HRP-estreptavidina y la de las laminas A y C con anti-lamina A/C. Se realizaron incubaciones con los anticuerpos anti-Sp1 como control de la FNS, anti-Rho GDI como control de la FCS y anti-ERK-2 como control de carga de proteína. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos.

La distribución de las laminas A y C se detectó preferentemente en la FNS, y en menor grado, en la FNRE. La distribución de las proteínas biotiniladas detectada mediante incubación con HRP-estreptavidina, en cambio, difería dependiendo de la prostaglandina con la que se trataran las células. En el caso de la 15d-PGJ₂-B, la distribución era similar en ambas fracciones. Sin embargo, en el caso de la PGA₁-B, las proteínas potencialmente modificadas se localizaban mayoritariamente en la FNS, y en menor grado en la FNRE. Como control de los fraccionamientos utilizamos anticuerpos frente a proteínas cuya localización subcelular es conocida, en concreto anticuerpos frente a Sp1 y Rho GDI como control de proteínas de la FNS y la FCS respectivamente.

Los fraccionamientos subcelulares también se llevaron a cabo en las células MEFs *LMNA* WT y KO, tras los tratamientos con ambas cyPG biotiniladas. Tal y como muestra la figura 32, en las células MEFs *LMNA* WT, las laminas A y C se localizaron mayoritariamente en la FNS y en menor grado en la FNRE, tal y como se había observado en las células U2OS. Como era de esperar, no se detectó la presencia de las laminas A y C en las MEFs *LMNA* KO. Las proteínas potencialmente modificadas por ambos compuestos biotinilados se distribuyeron en la FNRE en mayor proporción que en la FNS. Como se puede observar, aún en ausencia de las laminas tipo A, se detectaron señales correspondientes a las proteínas biotiniladas, lo cual indica que existen otras dianas de cyPG en estas fracciones nucleares. Como controles del fraccionamiento se utilizaron los anticuerpos frente a Sp1 como control de proteínas de la FNS, frente a lamina B como control de las proteínas de la FNS y FNRE, y anticuerpo anti-LDH acoplado a peroxidasa como control de proteínas de la FCS.

Tanto los resultados de microscopía confocal como los obtenidos mediante Western Blot de los fraccionamientos subcelulares indicaron que los derivados biotinilados de 15d-PGJ₂ y PGA₁ modificaban proteínas que se localizaban en la envuelta nuclear y que colocalizaban con las laminas A y C en células U2OS y MEFs. Sin embargo, dichos ensayos no son suficientes para demostrar una interacción directa de las cyPG con las laminas A y C, en parte debido a la existencia de otras dianas potenciales.

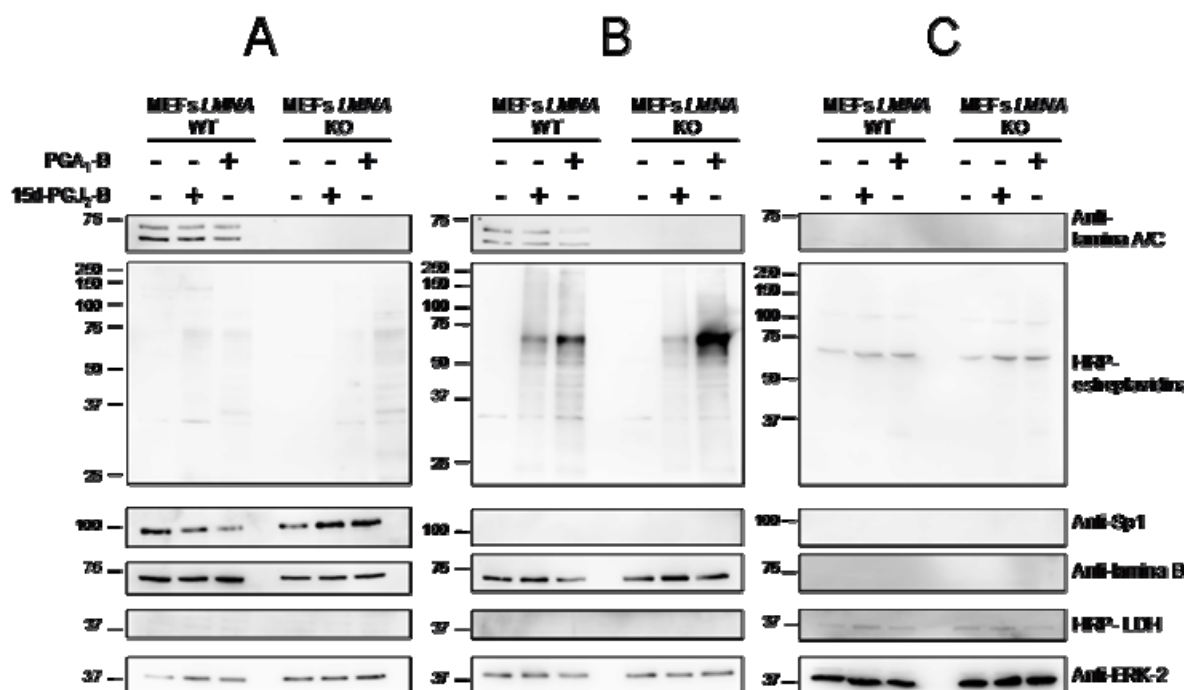


Figura 32. Distribución subcelular de las laminas tipo A y proteínas modificadas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en células MEFs. Las células MEFs LMNA WT y KO fueron tratadas con 15d-PGJ₂-B a concentración de 7 μ M, con PGA₁-B a concentración de 30 μ M, o con un volumen equivalente de vehículo durante 2 horas. A continuación, se llevaron a cabo fraccionamientos subcelulares y las muestras correspondientes a 75 μ g de proteína de la fracción nuclear soluble (FNS, A), la fracción nuclear resistente a la extracción resultante (FNRE, B) y 75 μ g de proteína de la fracción citosólica soluble (FCS, C) fueron procesadas por Western Blot. Se realizaron incubaciones con HRP-estreptavidina, con anti-lamina A/C, con anti-Sp1 como control de la FNS, con anti-lamina B como control de la FNS y FNRE, con HRP-LDH como control de la FCS y con anti-ERK-2 como control de carga de proteína. Estos resultados son los representativos de 3 ensayos independientes.

6.3 MODIFICACIÓN COVALENTE DE LAS LAMINAS A Y C POR cyPG BIOTINILADAS

Una vez observada la colocalización de las laminas A y C con las proteínas modificadas por las prostaglandinas biotiniladas, nos propusimos confirmar si ambas proteínas eran dianas para la modificación por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B. Para ello, nos planteamos a continuación experimentos de inmunoprecipitación a partir de células HEK-293T transfectadas con los plásmidos de expresión de la lamina A y lamina C acoplados a GFP.

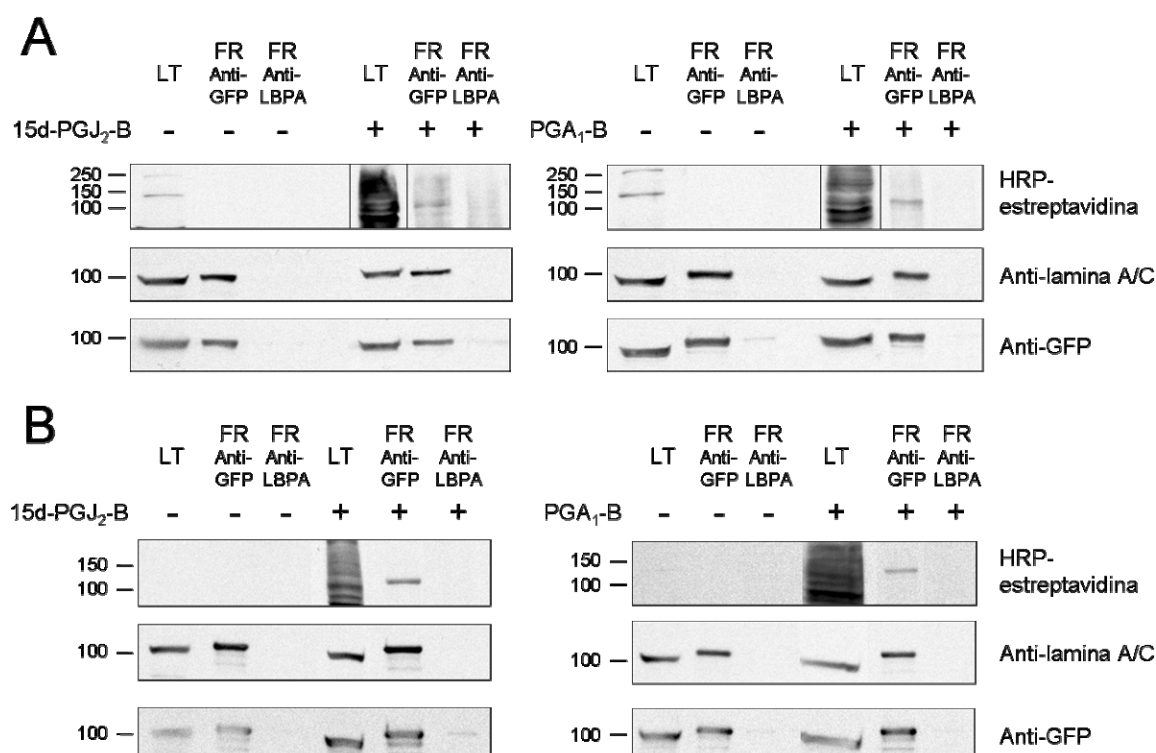


Figura 33. Inmunoprecipitaciones de GFP-lamina A y C. Las células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos de expresión de lamina C humana (A) y de lamina A humana (B) en fusión con GFP. A continuación, fueron tratadas con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B a concentraciones de 7 y 30 μ M respectivamente o con un volumen equivalente de vehículo, y los extractos celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GFP o anti-LBPA. Las muestras de los lisados celulares totales (LT) y de las proteínas inmunoprecipitadas (FR) fueron analizadas por Western Blot. La detección de la incorporación de biotina fue realizada mediante incubación con HRP-estreptavidina, y la de las proteínas de interés con anti-GFP y anti-lamina A/C. Las señales de HRP-estreptavidina mostradas de los lisados totales de células tratadas con las cyPG biotiniladas en (A) corresponden con exposiciones diferentes a las mostradas de las proteínas inmunoprecipitadas para evitar la sobreexposición. Los resultados mostrados son representativos de 2 ensayos.

En la figura 33 podemos observar que en los eluidos de las muestras inmunoprecipitadas con anti-GFP, se detectaron señales de biotina correspondientes a los pesos moleculares aparentes de la lamina A o C acopladas a GFP tras los tratamientos con ambas cyPG biotiniladas, siendo estas señales inexistentes en el caso de los eluidos de las muestras control y en las muestras inmunoprecipitadas con anti-LBPA, un anticuerpo no relacionado del mismo isotipo que el anti-GFP. La inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-LBPA descartó posibles uniones inespecíficas a la proteína G dependientes del isotipo de la inmunoglobulina.

Tras la incubación de las membranas con anti-lamina A/C, se observaron las correspondientes señales de GFP-lamina A o C en las muestras de los extractos totales y

en las de las fracciones retenidas tras la inmunoprecipitación con anti-GFP, pero no se observaron en los eluidos tras la inmunoprecipitación con anti-LBPA, poniendo de manifiesto que la retención de los complejos anticuerpo/GFP-lamina A y C por la proteína G es específica del anticuerpo anti-GFP.

Por último, la detección con anti-GFP al igual que en el caso anterior tal y como muestra la figura 33, mostró las señales de GFP correspondientes a las proteínas GFP-lamina A y C en las muestras de extractos celulares y en las muestras de las fracciones retenidas tras la incubación con anti-GFP, pero no se observaron señales en los eluidos de las muestras incubadas con anti-LBPA.

Tanto las señales de lamina A/C como las de GFP obtenidas en las proteínas inmunoprecipitadas con anti-GFP comigraban con las señales de biotina obtenidas anteriormente tras la incubación de las membranas con HRP-estreptavidina. Estos resultados unidos a los anteriormente descritos tras los ensayos de colocalización mediante inmunofluorescencia, demuestran que tanto la lamina A como la lamina C son dianas para la modificación por las prostaglandinas biotiniladas 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B.

6.4 IMPORTANCIA DEL RESIDUO DE CISTEÍNA 522 DE LAS LAMINAS A Y C EN LA MODIFICACIÓN POR cyPG BIOTINILADAS

Una vez confirmadas la lamina A y la lamina C como dianas para la modificación por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B, nos planteamos a continuación estudiar la importancia del residuo de cisteína 522 en la modificación por las dos prostaglandinas biotiniladas. Dicho residuo es el único residuo de cisteína que posee la lamina C, y aunque la isoforma A posee otros 4 residuos más de cisteína en su secuencia, el hecho de que ambas isoformas compartan ese residuo de cisteína hizo que exploráramos en primer lugar la posible modificación de este residuo por las cyPG.

Realizamos transfecciones transitorias en células HEK-293T con los plásmidos de expresión de las laminas A y C en sus formas silvestre (WT) y mutante C522S acopladas a GFP, seguidas de tratamientos con la 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B y se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones con anticuerpo anti-GFP como se ha descrito anteriormente. Las membranas obtenidas fueron incubadas con HRP-estreptavidina, y tal y como refleja la figura 34, se observaron importantes diferencias al comparar la modificación por las dos

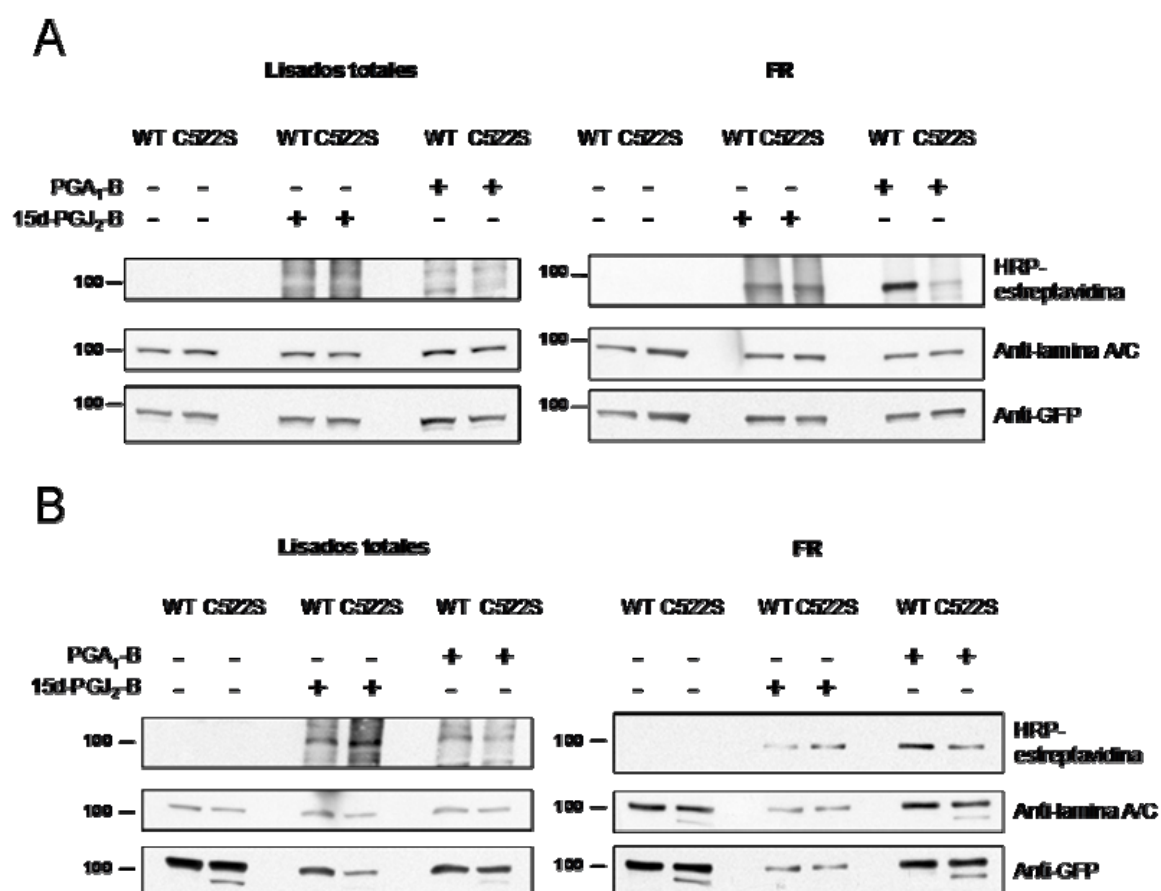


Figura 34. Inmunoprecipitaciones de GFP-lamina A y C WT y mutante C522S. Las células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos de expresión de la lamina C WT y mutante C522S (A), y de la lamina A WT y mutante C522S (B) en fusión con GFP y tratadas posteriormente con 15d-PGJ₂-B a una concentración de 7 μ M, PGA₁-B a 30 μ M o un volumen equivalente de vehículo. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-GFP, y las alícuotas de los lisados celulares totales y de los inmunoprecipitados (FR) fueron analizadas por Western Blot. La incorporación de biotina se detectó mediante incubación con HRP-estreptavidina y se realizaron incubaciones con anticuerpos anti-GFP y anti-lamina A/C para detectar las proteínas de interés. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes.

prostaglandinas dependiendo de la prostaglandina biotinilada utilizada y de la lamina estudiada.

Si analizamos las fracciones retenidas tras la inmunoprecipitación con anti-GFP, solo en el caso de las células tratadas con las prostaglandinas biotiniladas observamos unas bandas de biotina correspondientes a las proteínas GFP-lamina A y C WT o C522S.

En el caso de GFP-lamina C (Figura 34A), si comparamos el patrón de modificación de ambas prostaglandinas, podemos observar que no existen diferencias apreciables de

señal de biotina entre la proteína inmunoprecipitada WT y C522S tras los tratamientos con 15d-PGJ₂-B, mientras que en el caso de PGA₁-B, la mutación de la cisteína 522 en la lamina C reduce la señal de biotina de forma muy marcada (reducción de la incorporación estimada en un 70%, media de 2 experimentos). Esto indica que este residuo de cisteína es probablemente diana para la modificación por PGA₁-B, mientras que en el caso de la 15d-PGJ₂-B, pueden existir otros aminoácidos implicados en la modificación (Figura 34A).

Tras la incubación de las membranas con anti-lamina A/C y anti-GFP, se observaron las señales correspondientes a las proteínas GFP-lamina C WT y C522S, y dichas señales comigraban con las señales de biotina obtenidas tras la incubación de las membranas con HRP-estreptavidina en los casos de las muestras tratadas con 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B.

En el caso de GFP-lamina A WT y C522S, tras la incubación de las membranas con HRP-estreptavidina, pudieron observarse diferencias de señal de biotina en las fracciones eluidas tras la inmunoprecipitación con anti-GFP y tratadas con las cyPG biotiniladas. Tras los tratamientos con 15d-PGJ₂-B, se apreció un ligero aumento de señal de biotina de la proteína inmunoprecipitada C522S con respecto a la WT, mientras que tras los tratamientos con PGA₁-B, la lamina A C522S inmunoprecipitada revela una menor modificación que la proteína WT, aunque en este caso, la reducción en la incorporación de biotina no es tan drástica como en el caso de la lamina C (incorporación reducida en un 50%, media de 2 experimentos) (Figura 34B).

Se obtuvieron las señales correspondientes a las proteínas GFP-lamina A WT y C522S de las muestras de las fracciones eluidas de la inmunoprecipitación tras la incubación de las membranas con los anticuerpos anti-lamina A/C y anti-GFP. Estas señales comigraban con las señales de biotina obtenidas anteriormente. Esto pone de manifiesto que las diferencias observadas en las señales de biotina no son debidas a diferencias en la cantidad de proteína cargada o inmunoprecipitada.

Estos resultados muestran que existen diferencias en los patrones de modificación de las laminas A y C por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B. En conjunto, el residuo de C522 parece ser importante para la modificación de las laminas A y C por PGA₁-B, sobre todo en el caso de la lamina C. Sin embargo, nuestros resultados indican que la modificación de las laminas A y C por la 15d-PGJ₂-B no depende de esta cisteína, y sugiere que en esta modificación deben de estar implicados otros residuos de estas proteínas.

DISCUSIÓN

1. ESTABILIDAD DE LA MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES POR cyPG

La modificación de proteínas celulares es uno de los principales mecanismos de acción de las cyPG. Esta modificación se caracteriza por ser una unión covalente y para la que el grupo carbonilo α,β -insaturado de las cyPG es esencial. Las cyPG con estructura de enona simple o dienona, difieren en su distribución subcelular y en la estabilidad de su unión a tioles solubles. Dichas diferencias pueden explicar su diferente efectividad en la actividad antiproliferativa, antiviral o antiinflamatoria (Narumiya *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1997b; Rossi *et al.*, 2000; Santoro, 1997).

La estabilidad de la modificación de tioles solubles como el glutathione (GSH) por cyPG depende de la estructura de la cyPG (Suzuki *et al.*, 1997b). Así, se ha descrito que cyPG dienonas, como la Δ^{12} -PGJ₂ o Δ^7 -PGA₁ metil éster, forman aductos reversibles con el GSH, ya que en solución, existe un equilibrio entre el aducto y las cyPG y el GSH en sus formas libres. Sin embargo, en el caso de cyPG enonas, como la PGA₁ metil éster, la formación de aductos con GSH resulta ser más estable, desplazándose el equilibrio hacia la formación de aductos (Suzuki *et al.*, 1997b). La proporción de cyPG en su forma libre con respecto a la forma conjugada a GSH es mayor en cyPG dienonas que en enonas sencillas, y esto explica la actividad citotóxica de las dienonas frente a la actividad citostática descrita para las enonas sencillas en células leucémicas de ratón L1210, ya que la fracción libre de cyPG es la que queda disponible para poder interaccionar con las moléculas diana y desencadenar los efectos antiproliferativos (Narumiya *et al.*, 1987; Noyori y Suzuki, 1993). Utilizando una resina de sefarosa compuesta de tioles inmovilizados como modelo experimental de proteína, se ha descrito que la unión de las cyPG a la resina es irreversible en condiciones fisiológicas, ya que solo es posible la rotura de esta unión en presencia de álcali (Suzuki *et al.*, 1997b). En el caso de la proteína GSTP1-1 se ha descrito que la modificación por PGA₂ puede revertirse en presencia de exceso de GSH *in vitro*, indicando la posibilidad de que se produzca una reacción retro-Michael (van Iersel *et al.*, 1999). Sin embargo, no existen datos sobre la estabilidad de la unión de cyPG a proteínas en modelos celulares.

En nuestras condiciones experimentales, hemos observado que la modificación de proteínas celulares por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B no es estable en el tiempo. El hecho de que el descenso observado en la señal de proteínas modificadas por ambas cyPG no

resulte afectado por la inhibición de la degradación de proteínas, puede indicar que existan en la célula mecanismos que hagan que esta modificación sea de alguna forma reversible.

Se ha sugerido que la acumulación de cyPG en el interior celular es un proceso reversible. En células L1210 se ha descrito un sistema de transporte de cyPG que permite la entrada de las cyPG al citoplasma de forma rápida, un transporte hacia el interior del núcleo, y un transporte implicado en la expulsión de las cyPG desde el citosol al medio extracelular. Todos ellos poseen una actividad óptima a 37 °C (Narumiya *et al.*, 1986). Estos sistemas de transporte influyen en la actividad de las cyPG, ya que determinan la localización de las mismas en la célula. En un experimento con Δ^{12} -PGJ₂ marcada radiativamente se observó que tras los tratamientos de las células L1210 con esta cyPG, y posteriores lavados e incubación en ausencia de cyPG, la mayor parte de la radiactividad detectada previamente en el citoplasma era detectada en el medio extracelular tras la segunda incubación (Narumiya *et al.*, 1986). Esto indica que la incorporación y la expulsión de cyPG intracelulares es dependiente del gradiente de concentración entre el medio y la célula (Noyori y Suzuki, 1993).

Más recientemente se ha descrito que los sistemas de transporte MRP1 y MRP3 están implicados en la atenuación de los efectos citotóxicos y transactivadores de la 15d-PGJ₂ en células de cáncer de mama MCF7. Esta atenuación es dependiente de la formación del aducto de 15d-PGJ₂ con GSH (Paumi *et al.*, 2003). También se ha demostrado que los aductos de GSH y PGA₂ son transportados por MRP (Evers *et al.*, 1997).

Por tanto, en células intactas la modificación de proteínas por cyPG está regulada por diversos factores, como los sistemas de transporte que permiten la entrada de cyPG hacia el citoplasma y el interior nuclear, o la salida de las mismas hacia el medio extracelular. También influye la concentración intracelular de tioles solubles como el GSH, así como la estructura de las cyPG, que determina la estabilidad de la conjugación de las cyPG con los tioles solubles celulares. La existencia de los sistemas de expulsión de los aductos de cyPG con GSH así como la posibilidad de que la adición de Michael pueda revertirse sugiere que la modificación de proteínas celulares por cyPG biotiniladas puede ser un proceso reversible.

La unión de PGA₁-B a proteínas celulares desaparece de forma más rápida que la observada con 15d-PGJ₂-B. Las diferencias observadas en la modificación de proteínas celulares entre ambas cyPG biotiniladas pueden deberse a su distinta estructura.

Resultados previos de nuestro grupo determinaron que la incorporación de 15d-PGJ₂-B a proteínas celulares es más eficiente que la de PGA₁-B, pero la modificación inducida por PGA₁-B es más sensible a cambios en la concentración de GSH intracelular (Gayarre *et al.*, 2005).

Nuestros resultados sugieren que la modificación de proteínas en células intactas por cyPG biotiniladas es un proceso reversible, y que en la estabilidad de la modificación influye la estructura dienona o enona sencilla de la cyPG.

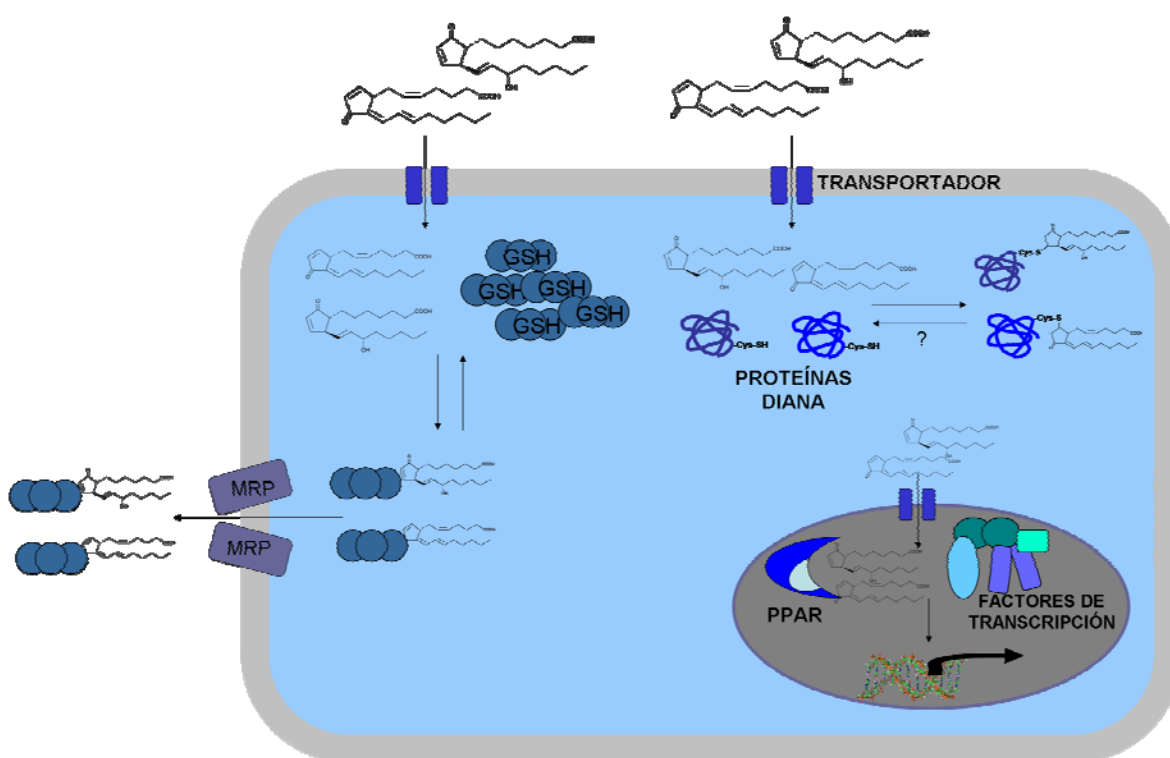


Figura 35. Distribución celular y mecanismos de acción de las cyPG. Se representan los sistemas de transporte de cyPG encargados de la entrada de cyPG al interior citoplasmático y nuclear (no caracterizados), así como los sistemas de expulsión (MRP). Una vez en el interior celular, las cyPG son susceptibles de conjugación con GSH y otros tioles solubles. La fracción de cyPG libre resultante puede modificar covalentemente las proteínas, interaccionar con las vías de señalización o con receptores nucleares (PPAR).

2. ESTUDIO DE LA UNIÓN DE cyPG AL DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDOS DE PPAR γ

Las diferencias estructurales entre 15d-PGJ₂ y PGA₁ pueden explicar también los resultados obtenidos en los ensayos de unión al LBD-PPAR γ y la consecuente activación de este receptor nuclear. Aunque está descrito que ambas cyPG activan PPAR γ , los mecanismos que desencadenan tal activación están bien caracterizados en el caso de 15d-PGJ₂, pero no tanto en el caso de la PGA₁ (Bishop-Bailey, 2000; Yu *et al.*, 1995; Forman *et al.*, 1997).

En los ensayos basados en la emisión de fluorescencia de ANS, algunos agonistas conocidos de PPAR γ como son la rosiglitazona, la 15d-PGJ₂ y el CAY10410 son capaces de desplazar al ANS del dominio de unión a ligandos, mientras que la PGA₁ en este ensayo no compete con el ANS. Estos resultados evidencian diferencias en el modo de interacción de ambas cyPG con el dominio de unión a ligandos de PPAR γ .

Tanto la 15d-PGJ₂ como el CAY10410 son capaces de unirse covalentemente al LBD (Shiraki *et al.*, 2005; Waku *et al.*, 2009b; Waku *et al.*, 2009a) y en dicha unión covalente está implicado un ajuste conformacional de la cadena lateral del LBD en torno a la cisteína 285 y el carbono en posición 13 de estos compuestos electrófilos (Shiraki *et al.*, 2005). El hecho de que el enlace covalente se produzca en dicha posición, puede explicar que la PGA₁ no muestre dicha competición en los ensayos basados en la emisión de fluorescencia, ya que carece de este carbono reactivo en su estructura. Se ha descrito que algunas PG como la PGA₁, PGA₂, PGD₂ o 15d-PGJ₂ son capaces de inducir una activación transcripcional de PPAR α y δ , pero no muestran afinidad por el receptor nuclear en ensayos de unión de ligandos, y se ha postulado que estos compuestos son en realidad compuestos precursores que son metabolizados en las células a ligandos de PPAR α y δ (Forman *et al.*, 1997). La PGA₁ puede desencadenar la activación de PPAR en diversos modelos celulares, como células U2OS (Yu *et al.*, 1995), o células mesangiales de rata (Garzon *et al.*, 2010), pero en nuestras condiciones experimentales, no pudimos detectar competición de esta cyPG por el bolsillo de unión a ligandos del LBD-PPAR γ , lo que puede indicar que la activación desencadenada no se debe a una interacción directa con este subtipo de receptor nuclear.

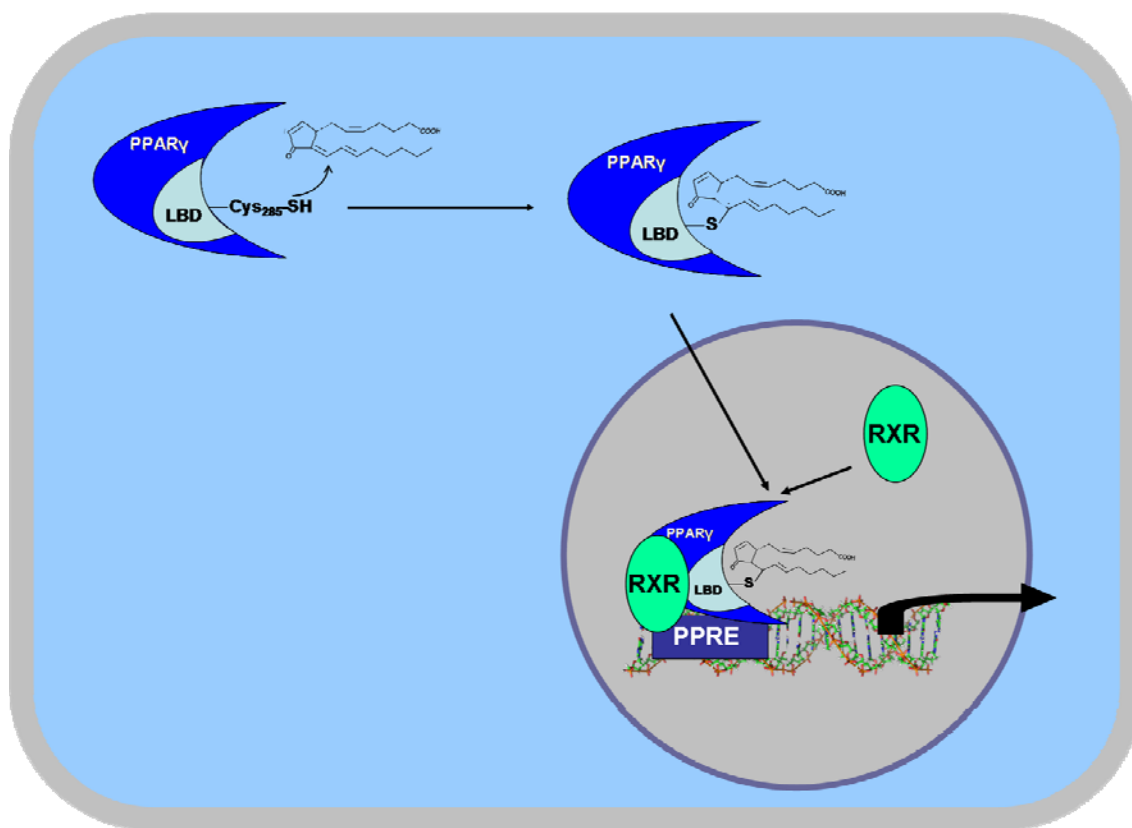


Figura 36. Mecanismo de la activación de PPAR γ mediada por 15d-PGJ $_2$. En la modificación de PPAR γ por la cyPG están implicados el C13 de la 15d-PGJ $_2$ y la cisteína en posición 285 de PPAR γ . Una vez traslocado al núcleo, el complejo 15d-PGJ $_2$ -B/PPAR γ forma un heterodímero con RXR, que induce la expresión de genes que poseen elementos PPRE en su promotor.

Al incubar el LBD-PPAR γ con los derivados biotinilados de 15d-PGJ $_2$ y PGA $_1$ *in vitro*, observamos que dichos compuestos se unen al LBD, aunque en ensayos de emisión de fluorescencia por competición con ANS, se determinó que la 15d-PGJ $_2$ -B se unía al LBD con una afinidad 10 veces menor que la 15d-PGJ $_2$. Dicha unión a LBD no es suficiente para activar el receptor, como se ha demostrado en los ensayos de reclutamiento de un péptido del coactivador SRC-1 mediante la medida de anisotropía de fluorescencia en presencia de 15d-PGJ $_2$ -B (Zorrilla *et al.*, 2010), o los ensayos de la actividad transcripcional dependiente de PPAR en células mesangiales de rata tratadas con 15d-PGJ $_2$ -B o PGA $_1$ -B (Garzon *et al.*, 2010; Zorrilla *et al.*, 2010).

Se ha descrito que la posición del grupo carbonilo α,β -insaturado de las cyPG dirige las interacciones que estos compuestos establecen con determinados residuos del LBD-PPAR γ . El grupo carboxílico de la 15d-PGJ $_2$ establece enlaces de hidrógeno con la tirosina en posición 473 de la hélice H12 presente en el LBD-PPAR γ y esta unión

estabiliza al ligando para poder adoptar la conformación adecuada para la unión covalente a la cisteína 285 (Waku *et al.*, 2009b). La conformación de la hélice H12 del LBD y su interacción con los ligandos determinan la unión a las proteínas correguladoras de PPAR γ y la consecuente activación del receptor nuclear (Waku *et al.*, 2009a). En el caso de los derivados biotinilados, el grupo carboxílico se halla acoplado a la estructura de biotina, impidiendo que se adopte la conformación adecuada para que el LBD pueda unirse a las moléculas coactivadoras.

Las cyPG de distinta estructura, como 15d-PGJ₂ y PGA₁, muestran diferente afinidad de unión al LBD-PPAR γ . En nuestros ensayos, la 15d-PGJ₂ compite con ANS para ocupar el bolsillo hidrofóbico de LBD-PPAR γ y modifica este dominio *in vitro*, mientras que PGA₁ no desplaza la unión al ANS. Las cyPG biotiniladas modifican *in vitro* el LBD-PPAR γ en nuestras condiciones experimentales, pero se ha descrito que no desencadenan una activación de PPAR, demostrando que la estructura de las cyPG es esencial no sólo en la unión a este receptor nuclear, sino en la activación del mismo. El conjunto de estos resultados sugiere que los análogos biotinilados de las cyPG podrían ser útiles en la observación de algunos efectos independientes de PPAR γ y en la identificación de las dianas implicadas.

3. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA PGA₁ Y SU ANÁLOGO BIOTINILADO

Los derivados biotinilados de algunos prostanoides electrófilos han sido utilizados en diversos estudios proteómicos para la identificación de dianas celulares de dichos compuestos (Stamatakis *et al.*, 2006; Aldini *et al.*, 2007; Landar *et al.*, 2006). La estructura de las cyPG determina la especificidad en la modificación de proteínas y muchas de sus actividades biológicas. Nos planteamos a continuación estudiar si la presencia de biotina podría afectar a otros efectos biológicos de la PGA₁ además de su capacidad para activar PPAR.

Se ha descrito que las cyPG inhiben la proliferación celular en diversos tipos celulares como células leucémicas murinas L1210 (Narumiya *et al.*, 1987), células humanas de glioma A172 (Tanikawa *et al.*, 1998), células de melanoma de origen humano y murino (Bhuyan *et al.*, 1986), y células eritroleucémicas humanas (Santoro *et al.*, 1986). También se ha demostrado que inducen apoptosis mediante un mecanismo independiente de PPAR en células epiteliales de carcinoma gástrico (Liu *et al.*, 2003) y en células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC) (Erl *et al.*, 2004). En fibroblastos

murinos NIH-3T3 pudimos comprobar que tanto la PGA_1 como su análogo biotinilado producían un descenso de la viabilidad celular. Es importante destacar que este efecto puede ser específico del tipo celular de acuerdo con resultados de otros grupos, ya que se ha demostrado que la PGA_1 y la PGJ_2 reducen la viabilidad celular en células inmortalizadas ECV-304, mientras que la viabilidad de las células HeLa no se ve afectada con por el tratamiento con PGA_1 (Erl *et al.*, 2004).

Aunque está descrito que la PGA_1 y diversos análogos de esta prostaglandina inducen parada del ciclo celular en la fase G_1 *in vitro*, y suprimen el crecimiento de células tumorales *in vivo* (Tanikawa *et al.*, 1998), el descenso de la viabilidad celular observado en fibroblastos NIH-3T3 tras el tratamiento con PGA_1 y $\text{PGA}_1\text{-B}$ no estaba relacionado con cambios significativos en el ciclo celular en nuestras condiciones experimentales (resultados no mostrados).

Las cyPG inducen mediadores citoprotectores, como las proteínas de choque térmico y la hemooxigenasa 1 así como la síntesis de glutathion (Amici *et al.*, 1992; Koizumi *et al.*, 1992; Ohno y Hirata, 1990). La hemooxigenasa es una enzima microsomal que cataliza el primer paso de la degradación del grupo hemo, siendo ésta además, la etapa limitante del proceso. Se han descrito en mamíferos tres isoformas de esta enzima: HO-1, HO-2 y HO-3. La HO-1 es la isoforma inducible y se expresa principalmente en hígado y bazo. Esta isoforma se induce de forma muy potente en respuesta al estrés celular y a estímulos oxidativos diversos, como el sustrato hemo, el choque térmico, la radiación UV, especies reactivas de oxígeno (ROS), citoquinas inflamatorias o prostaglandinas (Jozkowicz *et al.*, 2007).

Nuestros análisis pusieron de manifiesto que tanto la PGA_1 como la $\text{PGA}_1\text{-B}$ aumentaban la expresión de la HO-1 en fibroblastos NIH-3T3. Se ha descrito que la PGA_1 induce la expresión de HO-1 en diversos modelos celulares, como monocitos de origen humano (Elia *et al.*, 1999), mioblastos (Rossi y Santoro, 1995) y células de neuroblastoma de origen murino (Yan *et al.*, 2005), así como en modelos de isquemia cerebral en ratas *in vivo* (Xu *et al.*, 2007). Aunque se desconocen muchos aspectos de los mecanismos que desencadenan la inducción de la HO-1 mediada por la PGA_1 , es considerada una respuesta adaptativa al aumento del estrés oxidativo (Xu *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2005). Además, el grupo carbonilo α,β -insaturado de la cyPG parece ser decisivo para este efecto, ya que prostaglandinas de las series E y F, que no poseen este grupo reactivo, no son capaces de inducir la síntesis de HO en mioblastos murinos (Rossi y Santoro, 1995).

Se ha descrito que la 15d-PGJ₂ activa diversas rutas que controlan la síntesis de GSH y HO-1 en varios modelos celulares (Chen *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Wayman *et al.*, 2002). La inducción de estos antioxidantes intracelulares por esta cyPG está regulada por mecanismos independientes de PPAR γ , y es debida en gran parte a la modificación covalente del residuo de cisteína en posición 273 de la proteína Keap-1 (Kobayashi *et al.*, 2009; Levonen *et al.*, 2004). Esta modificación disminuye la degradación del factor de transcripción Nrf2 por el proteasoma e induce la posterior activación de la expresión de proteínas bajo el control de los elementos de respuesta antioxidante (ARE) como la HO-1 y la enzima responsable de la síntesis de GSH, la γ -glutamyl-cisteína sintetasa (γ -GCS) (Osburn y Kensler, 2008). En células endoteliales bovinas (BAEC) se ha observado una acumulación de un aducto covalente de Keap-1 con 15d-PGJ₂ que guarda correlación con un aumento en la síntesis de GSH y HO-1 (Oh *et al.*, 2008) y en células HUVEC a concentraciones micromolares bajas de 15d-PGJ₂ se detecta un aumento de GSH intracelular debida a la inducción de la γ -GCS y la glutathion reductasa (Levonon *et al.*, 2001).

La enzima γ -GCS se compone de una subunidad catalítica (γ -GCSc), que es inhibida mediante regulación negativa por el GSH, y una subunidad ligera responsable de un papel regulador de la enzima (γ -GCSm). En nuestras condiciones experimentales, observamos un incremento de los niveles de la subunidad reguladora de la γ -GCS con concentraciones bajas de PGA₁, mientras que a concentraciones altas como 60 μ M, no se observaba ninguna inducción.

En diversas células de mamífero como células L-1210, HeLa S3, NIH-3T3 y células endoteliales de aorta porcina (PAEC), tras el tratamiento con PGA₂, se ha descrito que la acumulación de la cyPG en el núcleo es el primer paso para desencadenar la inducción de la γ -GCS (Ohno *et al.*, 1990). En fibroblastos NIH-3T3, la PGA₁-B modifica proteínas cuya distribución celular es mayoritariamente citosólica (Garzon *et al.*, 2010). Por tanto, puede que en el caso de la PGA₁ y su análogo biotinilado, la acumulación nuclear de las cyPG no se produzca en cantidades suficientes como para desencadenar la inducción. La inducción de γ -GCS por PGA₁ podría estar mediada por la activación de Nrf-2, ya que los promotores de las dos subunidades de la γ -GCS contienen elementos de respuesta antioxidante (ARE), y se ha descrito que algunos productos de la oxidación lipídica, como la 15d-PGJ₂, pueden inducir transcripcionalmente las subunidades de γ -GCS a través de ARE, mediante un mecanismo que implica la modificación covalente de residuos de cisteína de Keap-1, como en el caso de la inducción de HO-1 descrita anteriormente (Levonon *et al.*, 2004).

Los efectos observados en NIH-3T3 relacionados con el descenso en la viabilidad celular o la inducción de la HO-1 tras el tratamiento con PGA_1 y su análogo biotinilado, así como los efectos de ambas prostaglandinas observados anteriormente en RMC en respuesta a citoquinas proinflamatorias sobre la inducción de iNOS, de COX-2 y Hsp70 (Garzon *et al.*, 2010), muestran que PGA_1 -B desencadena efectos antiinflamatorios y citoprotectores similares a los de PGA_1 , y que dichos efectos son derivados de mecanismos independientes de PPAR. Por lo tanto, el estudio de las proteínas que se modifican covalentemente por PGA_1 -B puede resultar un abordaje útil en la identificación de las dianas de PGA_1 responsables de los efectos biológicos derivados de dicha modificación.

4. CONFIRMACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA PARA LA MODIFICACIÓN POR PGA_1 Y PGA_1 -B

Posteriormente a la identificación de dianas potenciales para la modificación de PGA_1 -B mediante abordajes proteómicos, pudimos confirmar valiéndonos de diversos ensayos como inmunoprecipitación o ensayos *in vitro* con proteínas recombinantes, que esta cyPG modifica ciertas proteínas celulares con muy diversas funciones. El hecho de que la PGA_1 compita con su análogo biotinilado por la modificación de determinadas dianas proteicas sugiere que los residuos de unión son comunes para ambas cyPG, y que la estructura de biotina no interfiere en dicha modificación.

Entre las dianas de PGA_1 -B destacan algunas proteínas del citoesqueleto, como son la actina, la vimentina, la tubulina o la α -actinina, así como la Hsp90 α , perteneciente al grupo de proteínas implicadas en la respuesta a estrés térmico. También se confirmaron como dianas de PGA_1 -B algunas proteínas de la etapa de elongación de la síntesis de proteínas, como son el EF-1 α y EF-2, así como proteínas de la vía glucolítica, como la GAPDH.

Muchos estudios han indicado la importancia del control de la etapa de elongación de la síntesis de proteínas durante el ciclo celular, el choque térmico, el envejecimiento o el estrés oxidativo. El EF-1 cataliza el primer paso de la elongación. Se encarga de fijar el aminoacil-ARNt que contiene la cadena polipeptídica en crecimiento en el sitio A del ribosoma. El EF-2 cataliza el tercer paso del ciclo de elongación, la traslocación, donde el ARNt unido a la cadena polipeptídica se mueve del sitio A del ribosoma al sitio P. El EF-2 está relacionado con la regulación de la proliferación (Lamberti *et al.*, 2004), y está implicado en la enfermedad de Alzheimer, diabetes o envejecimiento (Ejiri, 2002).

Ambos factores pertenecen a la familia de proteínas de unión a GTP, y en el caso de EF-2, su actividad está modulada por modificaciones postraduccionales como ADP-ribosilación o fosforilación y se ha descrito que sufre modificación por S-nitrosilación (Gao *et al.*, 2005). Se han descrito diversas modificaciones del factor EF-1, incluyendo metilación, acetilación y miristoilación (Ejiri, 2002), S-nitrosilación (Gao *et al.*, 2005) así como S-glutathionilación. La S-glutathionilación del EF-1 α 1 se ha descrito que ocurre en la cisteína en posición 411 aunque se desconoce su repercusión funcional (Hamnell-Pamment *et al.*, 2005). Además de su papel central en la traducción de proteínas, este factor está implicado en tumorigénesis, apoptosis, degradación de proteínas mediadas por ubiquitina (Lamberti *et al.*, 2004) y organización del citoesqueleto (Ejiri, 2002).

La enzima GAPDH participa en la vía glucolítica, y su regulación a nivel transcripcional y postraducciona le confiere numerosas funciones celulares. Entre estas funciones destacan procesos como la endocitosis, el ensamblaje de la membrana nuclear (Robbins *et al.*, 1995) (Nakagawa *et al.*, 2003), el transporte de membranas entre el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi (Tisdale *et al.*, 2004), así como la dinámica del citoesqueleto (Huitorel y Pantaloni, 1985; Walsh *et al.*, 1989). Además de sus funciones citosólicas y de membrana, GAPDH interviene en la transcripción, por su interacción con la maquinaria de la ARN polimerasa II (Zheng *et al.*, 2003) así como en mecanismos de reparación del ADN (Meyer-Sieglar *et al.*, 1991). Se ha sugerido que la GAPDH es un regulador de la muerte celular, aunque se desconoce su verdadero papel, ya que algunos estudios la definen como un factor proapoptótico, mientras que otros proponen que ejerce una función protectora en la progresión tumoral (Colell *et al.*, 2009).

La GAPDH en humanos es una enzima sensible al estado redox, y su actividad se ve afectada por modificaciones covalentes en la cisteína 152 por agentes oxidantes. Esta enzima es inhibida por óxido nítrico (NO) mediante S-nitrosilación (Tisdale, 2002; Tisdale y Artalejo, 2006), por la unión de NAD⁺ tras S-nitrosilación (Mohr *et al.*, 1996), nitroalquilación por ácidos grasos nitrados (Batthyany *et al.*, 2006), S-glutathionilación por GSH y NO, así como por oxidación por peróxido de hidrógeno o peroxinitrito (Mohr *et al.*, 1999). Se ha descrito que estas modificaciones oxidativas de GAPDH contribuyen significativamente a la pérdida de función neuronal y a la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer (Butterfield *et al.*, 2010).

La Hsp90, una de las proteínas más abundantes en células eucarióticas, es una chaperona dependiente de ATP esencial para la supervivencia celular ya que regula proteínas que están implicadas en las vías de apoptosis, supervivencia y crecimiento

celular (Chiosis *et al.*, 2004). Se ha descrito que diversas cisteínas en el dominio C-terminal de la Hsp90 son importantes para su función (Nardai *et al.*, 2000), y que la Hsp90 es diana de S-tiolación reversible en residuos de cisteína durante estrés oxidativo en el riñón (Eaton *et al.*, 2003), así como de S-nitrosilación en células endoteliales, alterando su actividad ATPasa (Martinez-Ruiz *et al.*, 2005). Se ha identificado también que la Hsp90 es diana para la modificación por el derivado biotinilado de 15d-PGJ₂ en células mesangiales de rata (Stamatakis *et al.*, 2006). El hecho de que se haya descrito que la modificación por NO altera la actividad ATPasa, y dada la importancia de determinados residuos de cisteína en su función, la modificación de esta chaperona por cyPG podría tener repercusiones en la función de Hsp90 en la respuesta a estrés térmico. La inhibición de Hsp90 ha surgido como posible terapia para combatir diversas formas de cáncer (Hao *et al.*, 2010; Soti *et al.*, 2005). Recientemente se ha postulado el papel de Hsp90 en la modulación de muerte neuronal relacionada con la enfermedad de Parkinson (Kalia *et al.*, 2010).

Entre las proteínas confirmadas como dianas para la modificación de PGA₁-B se encuentran diversas proteínas que componen el citoesqueleto. La tubulina, componente de la red de microtúbulos, es una proteína rica en residuos de cisteína sensible a reacciones redox que juega un papel crucial en la división celular. Cambios en el estado redox de la tubulina o la alquilación de grupos sulfhidrilos funcionales puede llevar a un desacoplamiento de la polimerización de los microtúbulos y la inhibición de la proliferación celular (Landino *et al.*, 2004). Se ha descrito recientemente la modificación de las subunidades α y β de tubulina por 15d-PGJ₂ en los residuos de cisteína en posición 241, 305, 316, y 356 (Cocca *et al.*, 2009) y la modificación de esta proteína por el análogo biotinilado de esta cyPG en un modelo de células mesangiales de rata (Stamatakis *et al.*, 2006). Han surgido diversos compuestos utilizados en la terapia contra el cáncer que modifican la tubulina, y el residuo de cisteína de la tubulina en posición 239 resulta esencial para la actividad antitumoral de estos compuestos (Legault *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 1999). Puede plantearse por tanto que la modificación de la tubulina por las cyPG contribuya a los efectos antiproliferativos de estos compuestos (Pignatelli *et al.*, 2005; Stamatakis *et al.*, 2006).

Se ha descrito la modificación de actina por cyPG en diversos modelos celulares, como la modificación por la 15d-PGJ₂-B en RMC (Stamatakis *et al.*, 2006) y en células de neuroblastoma humano (Aldini *et al.*, 2007), así como la modificación por la 15d-PGJ₂-B y la PGA₁-B en fibroblastos NIH-3T3 intactos (Gayarre *et al.*, 2006). La modificación de actina recombinante por 15d-PGJ₂ y HNE induce cambios en la morfología de los

filamentos (Gayarre *et al.*, 2006) y se ha descrito que el residuo de cisteína en posición 374 se modifica por 15d-PGJ₂ en ensayos *in vitro* con actina recombinante (Aldini *et al.*, 2007). Este residuo de cisteína resulta crítico para la polimerización de la actina ya que la rotura proteolítica del dipéptido terminal de la actina que engloba la C374 y la F375 desencadena un descenso en la polimerización de la actina (Mossakowska *et al.*, 1993). La modificación de la actina por 15d-PGJ₂ se ha relacionado con la desestructuración del citoesqueleto de actina en células de neuroblastoma humano (Aldini *et al.*, 2007). Diversos estudios han identificado a la actina como una importante diana de modificación por tiolación o carbonilación en modelos de inflamación, daño oxidativo y en pacientes (Keshavarzian *et al.*, 2003). Sin embargo, dada la abundancia de esta proteína en la célula, la importancia funcional de la modificación de actina podría depender de la proporción que resulte modificada en cada tipo celular.

La familia de las α -actininas comprende 4 isoformas que originalmente se definieron como proteínas que se unían a los filamentos de actina. Están presentes en múltiples compartimentos subcelulares, y actualmente se les atribuyen diversas funciones en la célula, como la unión de proteínas transmembrana al citoesqueleto, la regulación de la actividad de diversos receptores, y la conexión del citoesqueleto con diversas vías de señalización (Otey y Carpen, 2004). Se ha descrito que la deficiencia en α -actinina 3 produce cambios importantes en el metabolismo del músculo esquelético (Lek y North, 2010). Existe un mecanismo de regulación de la α -actinina por fosforilación en residuos de tirosina que disminuye la afinidad de esta proteína por la actina (Sjoblom *et al.*, 2008). Recientemente se ha identificado a la α -actinina 4 como diana para la modificación por HNE en el residuo de cisteína en posición 499 en las células monocíticas de origen humano THP-1, aunque la repercusión funcional de esta modificación aún se desconoce (Chavez *et al.*, 2010).

Hemos confirmado que la PGA₁-B modifica múltiples dianas celulares implicadas en numerosos procesos celulares y en algunos casos, como la GAPDH y la tubulina, son proteínas sensibles al estado redox celular cuya actividad está regulada por la modificación postraducciona de cisteínas. La modificación de proteínas por cyPG puede suponer un mecanismo de regulación de las funciones de estas proteínas y la identificación de proteínas diana para la modificación por cyPG puede ser útil en el estudio del papel que juega el estado redox en la regulación de las mismas.

5. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FILAMENTOS INTERMEDIOS POR cyPG

Entre las dianas identificadas para la modificación por 15d-PGJ₂ y PGA₁ figuran proteínas que componen los filamentos intermedios, como son la vimentina y las laminas A y C. La vimentina compone la red citoplasmática de filamentos intermedios y además de participar en la resistencia mecánica de la célula, interviene en los procesos de adhesión y migración celular así como en rutas de señalización celular. Las laminas A y C componen la envuelta nuclear, y además de su papel en el mantenimiento de la estructura nuclear, interaccionan con factores de transcripción y componentes de rutas de señalización celular.

Las tres proteínas comparten la estructura común de la familia de los filamentos intermedios, dividida en tres dominios.

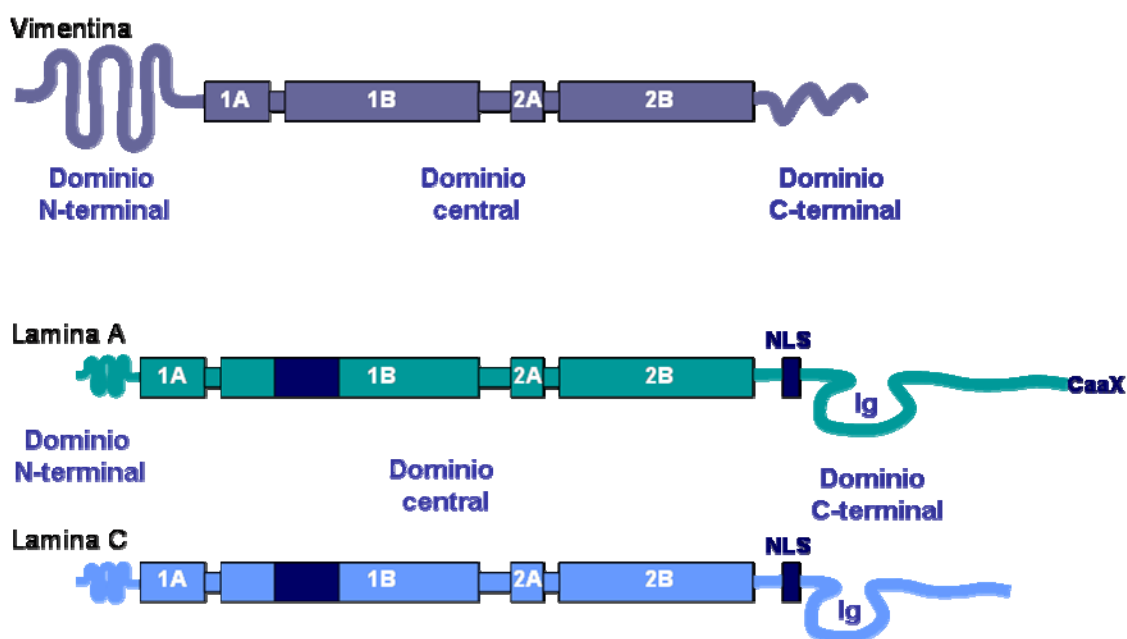


Figura 37. Representación esquemática de la estructura de la vimentina y de las laminas A y C. Las tres proteínas poseen una estructura dividida en tres dominios: el dominio central, constituido por 4 segmentos unidos en dos estructuras de α -hélice: la hélice 1 compuesta por los segmentos 1A y 1B y la hélice 2, compuesta de los segmentos 2A y 2B. En el segmento 1B, las laminas albergan una secuencia adicional de 42 aminoácidos (6 héptadas) de la que carecen las demás proteínas de IF, representada en azul oscuro. El dominio central está flanqueado por los dominios N y C-terminales, que no adoptan la conformación de α -hélice. El dominio C-terminal de las laminas adopta una estructura de inmunoglobulina (Ig). Entre el extremo C-terminal del dominio central y el dominio Ig, las laminas poseen además una secuencia de señal de localización nuclear (NLS). La lamina A posee una caja CaaX que es diana para modificaciones postraduccionales.

El dominio C-terminal de las laminas difiere del resto de proteínas de IF, ya que aparte de adoptar una estructura de inmunoglobulina (Ig), poseen una señal de localización nuclear, que no está presente en otras proteínas de IF, y es la secuencia que dirige el ensamblaje de los filamentos de laminas en la envuelta nuclear, a diferencia de las demás proteínas de esta familia, que componen una red citoplasmática de filamentos intermedios (Broers *et al.*, 2006) (Figura 37).

Nos propusimos estudiar en mayor profundidad la modificación de estas proteínas que constituyen la red de filamentos intermedios por cyPG como la 15d-PGJ₂ y la PGA₁, y caracterizar dicha modificación siguiendo diversos abordajes experimentales.

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE LA VIMENTINA POR PGA₁-B

La modificación de vimentina por PGA₁-B despertó nuestro interés al haberse observado previamente en el laboratorio que esta proteína era diana también para la 15d-PGJ₂, y que la cisteína de la vimentina era importante para el efecto de esta cyPG sobre la organización de los filamentos. La sustitución del residuo de cisteína por serina atenuaba el colapso de los filamentos de vimentina que se observaba al tratar células mesangiales de rata (RMC) con la 15d-PGJ₂ (Stamatakis *et al.*, 2006).

Mediante abordajes proteómicos, pudimos identificar a la vimentina como diana potencial de la PGA₁-B en fracciones de membrana de fibroblastos NIH-3T3. Quisimos explorar a continuación diversos aspectos de la modificación de vimentina por PGA₁-B. Para ello, mediante ensayos *in vitro* con la proteína recombinante, observamos que la modificación de vimentina era dependiente de la concentración de PGA₁-B y no variaba con la concentración del agente reductor en el medio de incubación. La cyPG competía con la iodacetamida biotinilada por su unión a la proteína, lo que sugiere que para que se produzca la modificación por esta cyPG, es importante que existan grupos tioles libres en la vimentina.

Nos propusimos el estudio del residuo de modificación mediante el empleo del análisis por espectrometría de masas. Para optimizar la identificación del sitio de modificación, pusimos a punto un protocolo de enriquecimiento de péptidos modificados en las muestras tratadas con PGA₁-B, mediante la utilización de una resina de avidina. Se pudo así obtener la secuencia del péptido que albergaba dicha modificación, e identificar a la cisteína en posición 328 como residuo de la modificación. Mediante el uso de un mutante

en el residuo de C328 de la vimentina humana confirmamos que la modificación se producía en este residuo en células COS-7 intactas.

El hecho de que la vimentina posea un único residuo de cisteína en su secuencia, y que este residuo esté muy conservado entre especies, nos indicó la importancia que este residuo podría tener en la modificación por cyPG, así como en las posibles implicaciones biológicas de dicha modificación (Figura 38).

<i>Homo sapiens</i> (humano)	ESTEYRRQVQSLT C EVDALKGTNESLERQMRE
<i>Cercopithecus aethiops</i> (mono verde)	ESNEYRRQVQSLT C EVDALKGTNESLERQMRE
<i>Pan troglodytes</i> (chimpancé)	ESTEYRRQVQSLT C EVDALKGTNESLERQMRE
<i>Mus musculus</i> (ratón)	ESNEYRRQVQSLT C EVDALKGTNESLERQMRE
<i>Rattus norvegicus</i> (rata)	ESNEYRRQVQSLT C EVDALKGTNESLERQMRE
<i>Mesocricetus auratus</i> (hamster dorado)	ESNEYRRQVQSLT C EVDALKGTNESLERQMRE
<i>Sus scrofa</i> (cerdo)	ESNEYRRQVQSLT C EVDALKGTNESLERQMRE
<i>Bos taurus</i> (vaca)	ESNEYRRQVQTLT C EVDALKGTNESLERQMRE
<i>Gallus gallus</i> (pollo)	EANEYRRQIQSLT C EVDALKGSNESLERQMRE
<i>Xenopus laevis</i> (rana africana)	DTNDYRRQIQTLT C EIDAMKGSNESYERQMRE
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (trucha arco iris)	EANEYRRQVQALT C EVDSLKGTNESMERQMRE
<i>Cyprinus carpio</i> (carpa común)	EANDYRRQLQSLT C DLEALKGTNESLERQLRE

Figura 38. Alineamiento de secuencias de la vimentina correspondientes a diversas especies en el entorno de la cisteína.

Hasta el momento se han descrito diversas modificaciones postraduccionales de la vimentina, como la unión de N-acetil-glucosamina a residuos de serina (Wang *et al.*, 2007), responsable del mantenimiento de la rigidez de los filamentos de vimentina en modelos de nervio óptico (Farach y Galileo, 2008). Una de las modificaciones más estudiadas es la fosforilación en residuos de serina o treonina, cuya implicación en la reorganización de los filamentos se ha descrito en estudios *in vitro* y en diversos modelos celulares. Así, se ha determinado que la vimentina es fosforilada en los residuos de T457 y S458 por la acción de la p37 quinasa, y en la S55 por la acción de la p34 quinasa. En células epiteliales BHK-21 se ha demostrado que la fosforilación de los residuos situados en el extremo N-terminal determina la polimerización de los filamentos de vimentina durante la mitosis celular (Chou *et al.*, 1996).

La relevancia clínica del residuo de cisteína de la vimentina radica en su susceptibilidad para sufrir reacciones de oxidación con respecto a otras proteínas del citoesqueleto, tal y como se ha observado en pacientes de artritis reumatoide (Rogers *et al.*, 1989). Bajo condiciones oxidantes, esta cisteína puede participar en la formación de puentes disulfuro

entre parejas de dímeros de vimentina, conduciendo a la rotura de la estructura de filamentos *in vitro* (Rogers *et al.*, 1996). Se han descrito diversas modificaciones en este residuo de cisteína, como la S-glutathionilación producida tras la estimulación por acetilcolina en células de músculo liso de aorta (West *et al.*, 2006), o en linfocitos T humanos bajo condiciones oxidantes (Fratelli *et al.*, 2002). Este residuo también es susceptible de reacciones de S-nitrosilación, observada en células endoteliales tras someterlas a fuerzas de cizallamiento (Huang *et al.*, 2009), o la modificación por aldehídos reactivos, como el HNE, descrita en monocitos de origen humano (Chavez *et al.*, 2010). Este residuo de cisteína además es diana para la modificación por compuestos con actividad antitumoral y antiangiogénica, como la witaferina A (WTA), que se une covalentemente e induce la agregación de los filamentos de vimentina *in vitro*. En experimentos *in vivo* en células BAEC tratadas con WTA, se observa una condensación de filamentos de vimentina en torno al núcleo celular y se postula que la inhibición del crecimiento de los capilares sanguíneos descrita para este compuesto está mediada por la modificación de vimentina (Bargagna-Mohan *et al.*, 2007).

Para poder dilucidar la relevancia funcional del residuo de cisteína de la vimentina, nos planteamos ensayos de transfecciones estables en las células deficientes de vimentina SW12 cl.2, con los plásmidos de expresión de vimentina humana acoplados a GFP. La observación al microscopio confocal de dichos transfectantes estables sugirió que el residuo de cisteína era importante para la organización de los filamentos de vimentina, ya que las señales de vimentina de las células transfectadas con GFP-vimentina WT diferían de las observadas para la GFP-vimentina C328S. En este modelo experimental no pudimos observar filamentos completos de vimentina. Las estructuras cortas filamentosas que observamos en las células que expresaban de forma estable GFP-vimentina WT eran similares a las descritas por otros grupos en células SW13 cl.2 o en fibroblastos de ratones deficientes en vimentina (MFT16) transfectados transitoriamente con plásmidos de expresión de vimentina de rata en fusión con EGFP (Ho *et al.*, 1998). Estas estructuras filamentosas cortas se han observado también en las primeras etapas de la polimerización de los filamentos de vimentina de células SW13 cl.2 o MCF-7 deficientes de vimentina endógena transfectadas con plásmidos de expresión de vimentina de ratón acoplados a elementos de respuesta a hormonas (Sarria *et al.*, 1990).

Para descartar que la inexistencia de la red de filamentos de vimentina y que las diferencias observadas en las células transfectadas por ambos plásmidos se debieran a la expresión de la vimentina en fusión con GFP, realizamos a continuación transfecciones transitorias con plásmidos de expresión de vimentina WT y C328S libres de etiquetas.

Pudimos observar filamentos de vimentina cuya distribución era mayoritariamente perinuclear en células SW13 cl.2 transfectadas con la proteína WT. En el caso del mutante, no se pudo observar formación de filamentos, sino una señal puntiforme uniformemente distribuida por el citoplasma.

En nuestras condiciones experimentales utilizando las células SW13 cl.2, no pudimos obtener una red citoplasmática de filamentos de vimentina. Tal y como han descrito otros grupos, es necesaria una red endógena de filamentos intermedios o al menos de vimentina para que las proteínas quiméricas de GFP-vimentina puedan polimerizar correctamente y formar filamentos completos (Ho *et al.*, 1998; Yoon *et al.*, 1998). Las células SW13 cl.2 son deficientes en las proteínas citoplasmáticas de filamentos intermedios (Hedberg y Chen, 1986), y es por tanto posible que en este modelo celular no se pueda obtener dicha red de filamentos de vimentina tras la transfección con las construcciones de GFP o pCMV6-XL5-vimentina WT y C328S. Para poder continuar en el estudio de la implicación del residuo de cisteína de la vimentina en la estructura y ensamblaje de filamentos, será necesario un modelo celular compatible con la formación de una red endógena de filamentos intermedios. A pesar de estas limitaciones experimentales, ambos abordajes en células SW13 cl.2 demostraron la importancia del residuo de cisteína de la vimentina en la organización y ensamblaje de los filamentos.

5.2 ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE LAS LAMINAS A Y C POR LAS cyPG BIOTINILADAS

Las laminas son el principal componente de la envoltura nuclear, y la importancia de las laminas tipo A radica en que mutaciones en el gen *LMNA* originan una amplia variedad de patologías que cursan con desórdenes en diversos tejidos u órganos tales como cardiomiopatías, lipodistrofias o neuropatías. Se desconocen muchos aspectos de la regulación de estas proteínas, y el papel que juegan las cisteínas en esta regulación. Por ello, nos planteamos el estudio de la modificación de estas proteínas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B siguiendo diversos abordajes.

En estudios de microscopía confocal realizados en células U2OS, detectamos una colocalización de la señal de biotina con la señal de la lamina A acoplada a CFP, así como con la señal de las laminas A y C endógenas, sugiriendo que proteínas modificadas por la 15d-PGJ₂-B y la PGA₁-B se localizaban en la matriz nuclear con las laminas A y C. En fibroblastos de origen embrionario de ratones deficientes (MEFs *LMNA* KO) y no

deficientes (MEFs *LMNA* WT) en el gen *LMNA*, confirmamos la colocación de la lamina A con proteínas modificadas por las cyPG biotiniladas, pero observamos que esta colocación con proteínas de la envuelta nuclear no es exclusiva para las laminas tipo A, ya que existen otras proteínas que componen la matriz nuclear, como la lamina B, que también colocan con proteínas modificadas por estas cyPG.

Sirviéndonos de fraccionamientos subcelulares en los que aislamos la fracción citosólica soluble (FCS), la fracción nuclear soluble (FNS) y la nuclear resistente a la extracción (FNRE), pudimos estudiar mediante Western Blot la distribución subcelular de las proteínas modificadas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en células U2OS y MEFs, así como la de las laminas tipo A. Las laminas A y C se localizaron mayoritariamente en la FNS y en menor proporción en la FNRE en ambos tipos celulares. La distribución de las proteínas modificadas por las cyPG biotiniladas dependió del tipo celular y de la cyPG. En células U2OS, las proteínas modificadas por PGA₁-B se localizaron mayoritariamente en la FNS y en menor proporción en la FNRE. En las células MEFs *LMNA* WT y KO, las proteínas modificadas por ambas cyPG biotiniladas se localizaron principalmente en la FNRE, y en menor proporción en la FNS.

Estos resultados apoyan observaciones realizadas en otros modelos experimentales en los que se ha descrito una distribución subcelular de las proteínas modificadas por ambas cyPG biotiniladas dependiente del tipo celular. En concreto, mientras que la distribución de las proteínas modificadas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en fibroblastos murinos NIH-3T3 era mayoritariamente citosólica, en células epiteliales humanas de adenocarcinoma de cérvix HeLa se localizaban predominantemente en el núcleo (Garzon *et al.*, 2010). También se ha descrito que el GSH ejerce efectos directos sobre la distribución subcelular de las cyPG. La actividad de GST, la enzima responsable de la eliminación de cyPG mediante conjugación con GSH, puede determinar el predominio citosólico o nuclear de los efectos biológicos de las cyPG, como la inhibición de la vía de NF-κB. Tras el tratamiento con 15d-PGJ₂, se ha observado que en células con actividad de GST citosólica elevada, como en células HeLa, los efectos desencadenados sobre la vía de NF-κB son nucleares, como el bloqueo de la unión de NF-κB al ADN. En otros tipos celulares, como macrófagos murinos, la actividad de GST es menor, y 15d-PGJ₂ ejerce efectos citoplasmáticos, inhibiendo la degradación de la subunidad inhibitoria IκB y la actividad de IKK (Straus *et al.*, 2000).

Los ensayos de fraccionamiento sirvieron para completar los resultados de la microscopía confocal, y en conjunto, ambos abordajes confirman que ambas cyPG biotiniladas

modifican proteínas localizadas en la envuelta nuclear y cuya distribución subcelular coincide con la de las laminas A y C.

Los ensayos de inmunoprecipitación permiten confirmar si la modificación por cyPG biotiniladas a las proteínas de interés se produce por una interacción directa. En este tipo de ensayos observamos que las proteínas GFP-lamina A y C inmunoprecipitadas incorporaban biotina cuando las células eran tratadas con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B lo cual indica la modificación directa de las laminas A y C por ambas cyPG biotiniladas.

Las laminas A y C son sustrato de diversas modificaciones postraduccionales. Una de las mejor descritas es el procesamiento de la prelamina A a su forma madura. La lamina A se sintetiza como una forma precursora (prelamina), y esta proteína es diana en primer lugar de la farnesilación del residuo de cisteína presente en la secuencia consenso CSIM. Tras la isoprenilación tiene lugar la rotura proteolítica de los 3 últimos aminoácidos por la acción de la metaloproteasa Zmpste-24 o Rce1. A continuación, la cisteína es metilada por la acción de la ICMT (isoprenil-cisteína carboxil-metil-transferasa). La lamina A isoprenilada y carboxilmetilada sufre la proteólisis de los 15 últimos aminoácidos por la acción de la Zmpste-24 en la membrana nuclear interna (Broers *et al.*, 2006; Maltese, 1990). La pérdida del residuo de cisteína farnesilado explica la solubilidad de esta proteína y la capacidad de las laminas tipo A para desensamblarse de la envuelta nuclear durante la mitosis (Pugh *et al.*, 1997). Durante la interfase y mitosis, se ha descrito que las laminas se fosforilan en regiones del extremo N y C-terminal por acción de las quinasas mitóticas o la quinasa 1 dependiente de ciclinas (cdk1) tanto *in vitro* como *in vivo*, y la fosforilación de estas regiones está relacionada con el desensamblaje de los filamentos de lamina. Las mutaciones en determinados residuos de serina de las laminas tipo A previene de la despolimerización de las laminas durante la mitosis (Heald y McKeon, 1990; Ward y Kirschner, 1990).

Las laminas son sustrato de las enzimas ICE (IL-1 β -converting enzyme) que son activadas durante la apoptosis y producen la degradación de las laminas A y C. El sitio de proteólisis se ha localizado en el residuo de ácido aspártico en posición 230, y mutaciones en este residuo atenúan la apoptosis y retrasan la muerte celular (Rao *et al.*, 1996). Más recientemente se ha descrito que la lamina A es sumoilada en la lisina 201, y que dicha modificación es importante para su función celular. La sumoilación de la lamina A está implicada en los mecanismos moleculares que se producen en la cardiomiopatía familiar asociada a la mutación en el residuo 203 de la lamina A (Sarge y Park-Sarge, 2009; Zhang y Sarge, 2008). Durante la diferenciación de los mioblastos de rata y ratón

se ha identificado la dimetilación de la lamina C2 en el residuo de arginina en posición 209. Dichas metilaciones están involucradas en el desarrollo muscular y están mediadas por la acción de las metiltransferasas de arginina PRMT1 y PRMT5 (Kim *et al.*, 2011).

Las laminas tipo A son sensibles a cambios en el estado redox celular, y susceptibles de sufrir reacciones de oxidación de grupos tioles. Así, se ha identificado a las laminas tipo A como dianas de S-tiolación durante la isquemia/reperfusión inducida en riñones de rata (Eaton *et al.*, 2003). Las laminas A y C comparten una alta homología en su secuencia, siendo idénticas hasta el residuo 566, pero se diferencian en el extremo C-terminal.

A

Lamin A	<i>Homo sapiens</i> (humano).....	ATHSPPTDLVWKAQNTWGC ^{CG} NSLR
Lamin C	<i>Homo sapiens</i> (humano).....	ATHSPPTDLVWKAQNTWGC ^{CG} NSLR
Lamin AΔ10	<i>Homo sapiens</i> (humano).....	ATHSPPTDLVWKAQNTWGC ^{CG} NSLR
Lamin A	<i>Mus musculus</i> (ratón).....	ATHSPPTDLVWKAQNTWGC ^{CG} SSLR
Lamin C	<i>Mus musculus</i> (ratón).....	ATHSPPTDLVWKAQNTWGC ^{CG} SSLR
Lamin C2	<i>Mus musculus</i> (ratón).....	ATHSPPTDLVWKAQNTWGC ^{CG} SSLR
Lamin A	<i>Sus scrofa</i> (cerdo).....	ATHSPPADLVWKSQNTWGC ^{CG} NSLR
Lamin C	<i>Sus scrofa</i> (cerdo).....	ATHSPPADLVWKSQNTWGC ^{CG} NSLR
Lamin A	<i>Rattus norvegicus</i> (rata).....	ATHSPPTDLVWKAQNTWGC ^{CG} TSR
Lamin A/C	<i>Bos taurus</i> (vaca).....	ATHSPPTDLVWKAQNTWGC ^{CG} NSLR

B

Lamina A	GAGATHSPPTDLVWKAQNTWGC ^{CG} NSLR	TALINSTGEEVAMRKLVRSVTVV	550
Lamina C	GAGATHSPPTDLVWKAQNTWGC ^{CG} NSLR	TALINSTGEEVAMRKLVRSVTVV	550
Lamina A	EDDEDEDGDDLHHHHHGSH ^C SSSGDPAEYNLRSTVL ^{CGT} CGQPADKASA		600
Lamina C	EDDEDEDGDDLHHHHHVSGSRR-----		572
Lamina A	SGSGAQVGGPISSGSSASSVTVTRSYRSVGGSGGSGFDNLVTRSYLLGN		650
Lamina C	-----		
Lamina A	SSPRTQSPQN ^C SIM		650
Lamina C	-----		

Figura 39. Alineamiento de secuencias de las laminas A y C en el entorno de la cisteína en posición 522. (A) Se muestra el alineamiento de laminas tipo A de diversas especies en la región en torno a la C522. (B) Alineamiento del extremo C-terminal de las laminas A y C humanas. Se señalan en rojo los residuos de cisteína.

La lamina C solo posee un residuo de cisteína, localizado en posición 522 presente también en la lamina A, y que está conservado en otras especies de mamíferos (Figura 39). La lamina A posee en su secuencia cuatro residuos adicionales de cisteína,

localizados en posición 570, 588, 591 y 661. Éste último es el sitio de isoprenilación y metilación durante la maduración de la lamina A.

Nos planteamos por tanto explorar la posibilidad de que la modificación de las laminas A y C por las cyPG biotiniladas se localizara en el residuo 522 utilizando plásmidos de expresión de las laminas A y C WT y mutantes en la C522 mediante ensayos de inmunoprecipitación. En las proteínas inmunoprecipitadas se observaron diferencias en la intensidad de la señal de biotina detectada dependiendo de la cyPG biotinilada con la que se hubiera inducido la modificación.

En el caso de la modificación por PGA_1 -B, se observó que la cisteína en 522 de las laminas A y C era importante en su interacción con la cyPG, ya que la sustitución de este residuo por serina redujo considerablemente la señal de biotina detectada en las proteínas inmunoprecipitadas, sobre todo en la lamina C. Sin embargo, en la modificación de las laminas A y C producida por 15d-PGJ₂-B, el residuo de cisteína en posición 522 no parece esencial para la incorporación de la cyPG, puesto que la 15d-PGJ₂-B induce una modificación similar en las laminas WT y C522S. Estas observaciones sugieren que en la modificación por 15d-PGJ₂-B pueden estar implicados otros aminoácidos de las laminas A y C.

Las características estructurales de cada proteína y de las cyPG influyen en la modificación de polipéptidos por estos lípidos electrófilos. Es posible que prostaglandinas con estructura diferente modifiquen distintos residuos de la misma proteína, tal y como está descrito para la proteína H-Ras. Mientras que 15d-PGJ₂ forma un aducto mayoritario uniéndose preferentemente al péptido que contiene las cisteínas en posición 181 y 184 de H-Ras, la PGA_1 puede formar varios aductos, uniéndose preferentemente a la cisteína en posición 118 (Renedo *et al.*, 2007). Es posible que en la modificación de las laminas A y C por 15d-PGJ₂-B estén implicados residuos de las proteínas distintos de los residuos de cisteína. Hasta el momento las modificaciones de las cyPG se han identificado mayoritariamente en los residuos de cisteína, pero no podemos descartar que la adición de Michael también pueda producirse entre grupos electrófilos de las cyPG y grupos amino de las histidinas o lisinas. De hecho, se ha descrito recientemente que la Δ^{12} -PGJ₂ modifica la albúmina sérica humana en el residuo de histidina en posición 146 (Yamaguchi *et al.*, 2010).

El residuo de cisteína en posición 522 de las laminas A y C está localizado en el dominio C-terminal en la región que adopta el plegamiento tipo inmunoglobulina (región Ig). Esta

región posee una gran relevancia funcional, como sugiere el hecho de que se hayan detectado mutaciones de residuos localizados en esta zona relacionadas con laminopatías, como las mutaciones en G465 y R482, encontradas en pacientes de lipodistrofias parciales familiares, y las mutaciones en R453 y R527 detectadas en la distrofia muscular Emery-Dreyfuss. Además, estudios realizados en modelos celulares con mutantes en estos residuos han mostrado la presencia de graves alteraciones en la estructura nuclear (Hubner *et al.*, 2006; Broers *et al.*, 2005).

En ensayos preliminares de transfecciones en células HEK-293T con las laminas A y C WT y C522S acopladas a GFP hemos observado alteraciones que sugieren la posibilidad de que dicho residuo sea importante para la localización de la lamina C (Garzón y cols, resultados no publicados). Las señales de las laminas A WT y C522S se distribuían uniformemente en la periferia nuclear y no se detectaban diferencias entre la proteína WT y mutante. Las laminas C WT y C522S se localizaban en la envuelta nuclear pero de forma menos continua que la lamina A, siendo este efecto más acusado en el caso del mutante C522S. Estos resultados requieren confirmación en otros modelos celulares y abordajes adicionales que permitan el estudio de la relevancia funcional de la modificación del residuo C522 de la lamina C por las cyPG biotiniladas.

Cabe destacar que las proteínas que componen los filamentos intermedios citoplasmáticos interaccionan con las proteínas de la envoltura nuclear como se ha descrito en diversos trabajos. En células SW13 cl.2, deficientes en filamentos intermedios citoplasmáticos pero que expresan las laminas que componen la envuelta nuclear, la mayoría de los núcleos de las células se caracterizan por una morfología irregular, con núcleos frecuentemente plegados, formando lóbulos y hendiduras, si los comparamos con los núcleos de las células SW13 no deficientes en vimentina. El mismo patrón de morfología nuclear se observa en SW13 que expresan vimentina y son transfectadas con plásmidos de expresión de vimentina con un extremo C-terminal truncado (Sarria *et al.*, 1994). En células MEFs *LMNA* KO, la red de filamentos citoplasmáticos de vimentina está alterada, de tal forma que existe pérdida de la organización de estos filamentos e incluso existen zonas del citoplasma carentes de filamentos de vimentina (Broers *et al.*, 2004).

La modificación de la vimentina y de las laminas A y C por cyPG, y las posibles consecuencias de esta modificación sobre las funciones estructurales y biológicas de las proteínas de filamentos intermedios, pueden ayudar a explicar la posible regulación de las proteínas del citoesqueleto por estrés oxidativo, así como las actividades antitumorales, antivirales y antiinflamatorias descritas para estas prostaglandinas.

CONCLUSIONES

El desarrollo de este trabajo, en el que hemos validado la PGA₁-B como una herramienta eficaz para la identificación de dianas biológicas de las cyPG, nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. La modificación de proteínas celulares por las cyPG 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B no es estable en células intactas. La disminución de los niveles de proteínas biotiniladas es independiente de la degradación de proteínas.
2. La estructura de las cyPG determina la afinidad de estos compuestos por el LBD-PPAR γ . La 15d-PGJ₂ establece una unión de alta afinidad con el LBD, mientras que la PGA₁ no interacciona directamente con este subtipo de receptor nuclear en ensayos de competición de ligandos con el fluoróforo ANS.
3. La PGA₁-B reproduce algunos de los efectos biológicos de la PGA₁ en fibroblastos murinos, como la disminución de la viabilidad celular o la inducción de los niveles de proteínas citoprotectoras, como la HO-1.
4. El análogo biotinilado de la PGA₁ constituye una herramienta válida para el estudio de los efectos en los que interviene la modificación covalente de proteínas.
5. La combinación de diversos abordajes experimentales, como la cromatografía en avidina, ensayos *in vitro* con proteínas recombinantes, así como la inmunoprecipitación o inmunofluorescencia con anticuerpos específicos y el empleo de mutantes, permite la confirmación de las dianas celulares de cyPG biotiniladas identificadas por técnicas proteómicas.
6. La PGA₁-B modifica covalentemente proteínas implicadas en diversas funciones celulares, como proteínas de citoesqueleto entre las que se encuentran la actina, la α -actinina, la tubulina, la vimentina y las laminas tipo A. También se han confirmado como dianas de esta prostaglandina la proteína de choque térmico Hsp90, los factores de elongación EF-1 α y EF-2, así como la GAPDH.
7. El empleo de los ensayos de purificación de péptidos modificados por cyPG biotiniladas junto con técnicas proteómicas puede constituir un método de elección en la identificación del residuo de modificación por estos compuestos.
8. La PGA₁-B modifica covalentemente la vimentina en la cisteína localizada en posición 328. La presencia de este residuo de cisteína es importante para la polimerización de los filamentos de vimentina.

9. Las cyPG biotiniladas se unen a dianas presentes en la envuelta nuclear que colocalizan con las laminas nucleares.
10. Mediante ensayos de inmunoprecipitación hemos confirmado que las laminas A y C son modificadas por los análogos biotinilados de 15d-PGJ₂ y PGA₁.
11. La relevancia de la presencia del residuo de cisteína 522 de las laminas tipo A en dicha modificación es dependiente de la cyPG empleada. Este residuo de cisteína es importante en la modificación de la lamina C y en menor medida de la lamina A por la PGA₁-B.
12. La modificación de las laminas A y C por 15d-PGJ₂-B no depende de la presencia del residuo de cisteína 522. Estos resultados sugieren que las cyPG biotiniladas modifican selectivamente distintos residuos de las laminas A y C.

BIBLIOGRAFÍA

- Akimaru, K., Kuo, M. T., Furuta, K., Suzuki, M., Noyori, R. and Ishikawa, T. (1996).** Induction of MRP/GS-X pump and cellular resistance to anticancer prostaglandins. *Cytotechnology* **19**, 221-227.
- Aldini, G., Carini, M., Vistoli, G., Shibata, T., Kusano, Y., Gamberoni, L., Dalle-Donne, I., Milzani, A. and Uchida, K. (2007).** Identification of actin as a 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 target in neuroblastoma cells: mass spectrometric, computational, and functional approaches to investigate the effect on cytoskeletal derangement. *Biochemistry* **46**, 2707-2718.
- Amici, C., Sistonen, L., Santoro, M. G. and Morimoto, R. I. (1992).** Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6227-6231.
- Andres, V. and Gonzalez, J. M. (2009).** Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol* **187**, 945-957.
- Atsmon, J., Sweetman, B. J., Baertschi, S. W., Harris, T. M. and Roberts, L. J., 2nd (1990).** Formation of thiol conjugates of 9-deoxy-delta 9,delta 12(E)-prostaglandin D2 and delta 12(E)-prostaglandin D2. *Biochemistry* **29**, 3760-3765.
- Bargagna-Mohan, P., Hamza, A., Kim, Y. E., Khuan Abby Ho, Y., Mor-Vaknin, N., Wendschlag, N., Liu, J., Evans, R. M., Markovitz, D. M., Zhan, C. G., Kim, K. B. and Mohan, R. (2007).** The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin. *Chem Biol* **14**, 623-634.
- Batthyany, C., Schopfer, F. J., Baker, P. R., Duran, R., Baker, L. M., Huang, Y., Cervenansky, C., Branchaud, B. P. and Freeman, B. A. (2006).** Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem* **281**, 20450-20463.
- Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. (1997).** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**, 20313-20316.
- Bhuyan, B. K., Adams, E. G., Badiner, G. J., Li, L. H. and Barden, K. (1986).** Cell cycle effects of prostaglandins A1, A2, and D2 in human and murine melanoma cells in culture. *Cancer Res* **46**, 1688-1693.
- Bishop-Bailey, D. (2000).** Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* **129**, 823-834.
- Bishop-Bailey, D. and Hla, T. (1999).** Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* **274**, 17042-17048.
- Bogatcheva, N. V., Sergeeva, M. G., Dudek, S. M. and Verin, A. D. (2005).** Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res* **69**, 107-127.
- Broers, J. L., Kuipers, H. J., Ostlund, C., Worman, H. J., Endert, J. and Ramaekers, F. C. (2005).** Both lamin A and lamin C mutations cause lamina instability as well as loss of internal nuclear lamin organization. *Exp Cell Res* **304**, 582-592.
- Broers, J. L., Peeters, E. A., Kuipers, H. J., Endert, J., Bouten, C. V., Oomens, C. W., Baaijens, F. P. and Ramaekers, F. C. (2004).** Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet* **13**, 2567-2580.
- Broers, J. L., Ramaekers, F. C., Bonne, G., Yaou, R. B. and Hutchison, C. J. (2006).** Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* **86**, 967-1008.
- Bui, T., Kuo, C., Rotwein, P. and Straus, D. S. (1997).** Prostaglandin A2 specifically represses insulin-like growth factor-I gene expression in C6 rat glioma cells. *Endocrinology* **138**, 985-993.
- Butterfield, D. A., Hardas, S. S. and Lange, M. L. (2010).** Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* **20**, 369-393.
- Cagen, L. M., Pisano, J. J., Ketley, J. N., Habig, W. H. and Jakoby, W. B. (1975).** The conjugation of prostaglandin A1 and glutathione catalyzed by homogeneous glutathione S-transferases from human and rat liver. *Biochim Biophys Acta* **398**, 205-208.
- Castrillo, A., Diaz-Guerra, M. J., Hortelano, S., Martin-Sanz, P. and Bosca, L. (2000).** Inhibition of I κ B kinase and I κ B phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* **20**, 1692-1698.
- Ceaser, E. K., Moellering, D. R., Shiva, S., Ramachandran, A., Landar, A., Venkartraman, A., Crawford, J., Patel, R., Dickinson, D. A., Ulasova, E., Ji, S. and Darley-Usmar, V. M. (2004).** Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochem Soc Trans* **32**, 151-155.

- Cerella, C., Sobolewski, C., Dicato, M. and Diederich, M. (2010).** Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem Pharmacol* **80**, 1801-1815.
- Cernuda-Morollon, E., Pineda-Molina, E., Canada, F. J. and Perez-Sala, D. (2001).** 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* **276**, 35530-35536.
- Ciucci, A., Gianferretti, P., Piva, R., Guyot, T., Snape, T. J., Roberts, S. M. and Santoro, M. G. (2006).** Induction of apoptosis in estrogen receptor-negative breast cancer cells by natural and synthetic cyclopentenones: role of the IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB pathway. *Mol Pharmacol* **70**, 1812-1821.
- Cocca, C., Dorado, J., Calvo, E., Lopez, J. A., Santos, A. and Perez-Castillo, A. (2009).** 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 is a tubulin-binding agent that destabilizes microtubules and induces mitotic arrest. *Biochem Pharmacol* **78**, 1330-1339.
- Colell, A., Green, D. R. and Ricci, J. E. (2009).** Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ* **16**, 1573-1581.
- Collini, M., D'Alfonso, L., Molinari, H., Ragona, L., Catalano, M. and Baldini, G. (2003).** Competitive binding of fatty acids and the fluorescent probe 1-8-anilidonaphthalene sulfonate to bovine beta-lactoglobulin. *Protein Sci* **12**, 1596-1603.
- Corey, E. J., Andersen, N. H., Carlson, R. M., Paust, J., Vedejs, E., Vlattas, I. and Winter, R. E. (1968).** Total synthesis of prostaglandins. Synthesis of the pure dl-E1, -F1-alpha-F1-beta, -A1, and -B1 hormones. *J Am Chem Soc* **90**, 3245-3247.
- Cuzzocrea, S., Wayman, N. S., Mazzon, E., Dugo, L., Di Paola, R., Serraino, I., Britti, D., Chatterjee, P. K., Caputi, A. P. and Thiemermann, C. (2002).** The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Mol Pharmacol* **61**, 997-1007.
- Charles, R. L., Burgoyne, J. R., Mayr, M., Weldon, S. M., Hubner, N., Dong, H., Morisseau, C., Hammock, B. D., Landar, A. and Eaton, P. (2011).** Redox regulation of soluble epoxide hydrolase by 15-deoxy-{delta}-prostaglandin j2 controls coronary hypoxic vasodilation. *Circ Res* **108**, 324-334.
- Chavez, J., Chung, W. G., Miranda, C. L., Singhal, M., Stevens, J. F. and Maier, C. S. (2010).** Site-specific protein adducts of 4-hydroxy-2(E)-nonenal in human THP-1 monocytic cells: protein carbonylation is diminished by ascorbic acid. *Chem Res Toxicol* **23**, 37-47.
- Chen, C. W., Chang, Y. H., Tsi, C. J. and Lin, W. W. (2003).** Inhibition of IFN-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase induction by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2, involves inhibition of the upstream Janus kinase/STAT1 signaling pathway. *J Immunol* **171**, 979-988.
- Chen, Y., Morrow, J. D. and Roberts, L. J., 2nd (1999a).** Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J Biol Chem* **274**, 10863-10868.
- Chen, Y., Zackert, W. E., Roberts, L. J., 2nd and Morrow, J. D. (1999b).** Evidence for the formation of a novel cyclopentenone isoprostane, 15-A2t-isoprostane (8-iso-prostaglandin A2) in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1436**, 550-556.
- Chen, Z. H., Yoshida, Y., Saito, Y., Sekine, A., Noguchi, N. and Niki, E. (2006).** Induction of adaptive response and enhancement of PC12 cell tolerance by 7-hydroxycholesterol and 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 through up-regulation of cellular glutathione via different mechanisms. *J Biol Chem* **281**, 14440-14445.
- Chiosis, G., Vilenchik, M., Kim, J. and Solit, D. (2004).** Hsp90: the vulnerable chaperone. *Drug Discov Today* **9**, 881-888.
- Chou, Y. H., Opal, P., Quinlan, R. A. and Goldman, R. D. (1996).** The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells. *J Cell Sci* **109 (Pt 4)**, 817-826.
- Darnell, J. E., Jr. (1997).** STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-1635.
- Dechat, T., Adam, S. A. and Goldman, R. D. (2009).** Nuclear lamins and chromatin: when structure meets function. *Adv Enzyme Regul* **49**, 157-166.
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L. and Goldman, R. D. (2008).** Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* **22**, 832-853.
- Deribe, Y. L., Pawson, T. and Dikic, I. (2010).** Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 666-672.

- Dianzani, M. U. (2003).** 4-hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol Aspects Med* **24**, 263-272.
- Diez-Dacal, B. and Perez-Sala, D. (2010).** Anti-inflammatory prostanoids: focus on the interactions between electrophile signaling and resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal* **10**, 655-675.
- Dong, Y. G., Chen, D. D., He, J. G. and Guan, Y. Y. (2004).** Effects of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 on cell proliferation and apoptosis in ECV304 endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin* **25**, 47-53.
- Eaton, P., Jones, M. E., McGregor, E., Dunn, M. J., Leeds, N., Byers, H. L., Leung, K. Y., Ward, M. A., Pratt, J. R. and Shattock, M. J. (2003).** Reversible cysteine-targeted oxidation of proteins during renal oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* **14**, S290-296.
- Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T. and Martin, P. (2000).** Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci* **113** (Pt 13), 2455-2462.
- Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Langa, F., Aumailley, M., Delougee, A., Koteliansky, V., Babinet, C. and Krieg, T. (1998).** Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* **111** (Pt 13), 1897-1907.
- Ejiri, S. (2002).** Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 1-21.
- Elia, G., Polla, B., Rossi, A. and Santoro, M. G. (1999).** Induction of ferritin and heat shock proteins by prostaglandin A1 in human monocytes. Evidence for transcriptional and post-transcriptional regulation. *Eur J Biochem* **264**, 736-745.
- Eriksson, J. E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H. M. and Goldman, R. D. (2009).** Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* **119**, 1763-1771.
- Erl, W., Weber, C., Zerneck, A., Neuzil, J., Vosseler, C. A., Kim, H. J. and Weber, P. C. (2004).** Cyclopentenone prostaglandins induce endothelial cell apoptosis independent of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Eur J Immunol* **34**, 241-250.
- Evers, R., Cnubben, N. H., Wijnholds, J., van Deemter, L., van Bladeren, P. J. and Borst, P. (1997).** Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1. *FEBS Lett* **419**, 112-116.
- Farach, A. M. and Galileo, D. S. (2008).** O-GlcNAc modification of radial glial vimentin filaments in the developing chick brain. *Brain Cell Biol* **36**, 191-202.
- Fey, E. G., Wan, K. M. and Penman, S. (1984).** Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. *J Cell Biol* **98**, 1973-1984.
- Fitzpatrick, F. A. and Wynalda, M. A. (1983).** Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem* **258**, 11713-11718.
- Fletcher, D. A. and Mullins, R. D. (2010).** Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485-492.
- Forman, B. M., Chen, J. and Evans, R. M. (1997).** Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4312-4317.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M. and Evans, R. M. (1995).** 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803-812.
- Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberini, I., Salmona, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., Bachi, A., Vandekerckhove, J., Gianazza, E. and Ghezzi, P. (2002).** Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3505-3510.
- Fruchart, J. C., Duriez, P. and Staels, B. (1999).** Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **10**, 245-257.
- Funk, C. D. (2001).** Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-1875.
- Gao, C., Guo, H., Wei, J., Mi, Z., Wai, P. Y. and Kuo, P. C. (2005).** Identification of S-nitrosylated proteins in endotoxin-stimulated RAW264.7 murine macrophages. *Nitric Oxide* **12**, 121-126.

- Gao, L., Zackert, W. E., Hasford, J. J., Danekis, M. E., Milne, G. L., Remmert, C., Reese, J., Yin, H., Tai, H. H., Dey, S. K., Porter, N. A. and Morrow, J. D. (2003). Formation of prostaglandins E2 and D2 via the isoprostane pathway: a mechanism for the generation of bioactive prostaglandins independent of cyclooxygenase. *J Biol Chem* **278**, 28479-28489.
- Garzon, B., Gayarre, J., Gharbi, S., Diez-Dacal, B., Sanchez-Gomez, F. J., Timms, J. F. and Perez-Sala, D. (2010). A biotinylated analog of the anti-proliferative prostaglandin A1 allows assessment of PPAR-independent effects and identification of novel cellular targets for covalent modification. *Chem Biol Interact* **183**, 212-221.
- Garzon, B., Gharbi, S., Gayarre, J., Timms, J. and Perez-Sala, D. (2007). Modification of Lamin A/C by lipid electrophiles. *Progeria Workshop The Progeria Research Foundation San Diego, EEUU*.
- Gayarre, J., Sanchez, D., Sanchez-Gomez, F. J., Terron, M. C., Llorca, O. and Perez-Sala, D. (2006). Addition of electrophilic lipids to actin alters filament structure. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 1387-1393.
- Gayarre, J., Stamatakis, K., Renedo, M. and Perez-Sala, D. (2005). Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins PGA1 and 15-deoxy-Delta12,14-PGJ2: role of glutathione. *FEBS Lett* **579**, 5803-5808.
- Gazi, L., Gyles, S., Rose, J., Lees, S., Allan, C., Xue, L., Jassal, R., Speight, G., Gamble, V. and Pettipher, R. (2005). Delta12-prostaglandin D2 is a potent and selective CRTH2 receptor agonist and causes activation of human eosinophils and Th2 lymphocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **75**, 153-167.
- Gharbi, S., Garzon, B., Gayarre, J., Timms, J. and Perez-Sala, D. (2007). Study of protein targets for covalent modification by the antitumoral and anti-inflammatory prostaglandin PGA1: focus on vimentin. *J Mass Spectrom* **42**, 1474-1484.
- Ghosh, A. K., Bhattacharyya, S., Wei, J., Kim, S., Barak, Y., Mori, Y. and Varga, J. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. *FASEB J* **23**, 2968-2977.
- Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M. J. and Willoughby, D. A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* **5**, 698-701.
- Gonzalez, J. M., Navarro-Puche, A., Casar, B., Crespo, P. and Andres, V. (2008). Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J Cell Biol* **183**, 653-666.
- Gorospe, M., Liu, Y., Xu, Q., Chrest, F. J. and Holbrook, N. J. (1996). Inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity during growth arrest of human breast carcinoma cells by prostaglandin A2. *Mol Cell Biol* **16**, 762-770.
- Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**, 536-539.
- Hamnell-Pamment, Y., Lind, C., Palmberg, C., Bergman, T. and Cotgreave, I. A. (2005). Determination of site-specificity of S-glutathionylated cellular proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 362-369.
- Hao, H., Naomoto, Y., Bao, X., Watanabe, N., Sakurama, K., Noma, K., Motoki, T., Tomono, Y., Fukazawa, T., Shirakawa, Y., Yamatsuji, T., Matsuoka, J. and Takaoka, M. (2010). HSP90 and its inhibitors. *Oncol Rep* **23**, 1483-1492.
- Hardy, K. D., Cox, B. E., Milne, G. L., Yin, H. and Roberts, L. J., 2nd (2011). Nonenzymatic free radical-catalyzed generation of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J-like compounds (deoxy-J-isoprostanes) in vivo. *J Lipid Res* **52**, 113-124.
- Hata, A. N., Zent, R., Breyer, M. D. and Breyer, R. M. (2003). Expression and molecular pharmacology of the mouse CRTH2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 463-470.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**, 2195-2224.
- Heald, R. and McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* **61**, 579-589.
- Hedberg, K. K. and Chen, L. B. (1986). Absence of intermediate filaments in a human adrenal cortex carcinoma-derived cell line. *Exp Cell Res* **163**, 509-517.
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Chu, Y. W., Trevor, K. T. and Seftor, R. E. (1996). Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **15**, 507-525.
- Heneka, M. T., Feinstein, D. L., Galea, E., Gleichmann, M., Wullner, U. and Klockgether, T. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists protect cerebellar

- granule cells from cytokine-induced apoptotic cell death by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Neuroimmunol* **100**, 156-168.
- Henrion, D., Terzi, F., Matrougui, K., Duriez, M., Boulanger, C. M., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Briand, P., Friedlander, G., Poitevin, P. and Levy, B. I. (1997). Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest* **100**, 2909-2914.
- Herrmann, H. and Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* **73**, 749-789.
- Herrmann, H., Fouquet, B. and Franke, W. W. (1989). Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. I. cDNA clones encoding different forms of vimentin. *Development* **105**, 279-298.
- Hilliard, M., Frohnert, C., Spillner, C., Marcone, S., Nath, A., Lampe, T., Fitzgerald, D. J. and Kehlenbach, R. H. (2010). The anti-inflammatory prostaglandin 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ2 inhibits CRM1-dependent nuclear protein export. *J Biol Chem* **285**, 22202-22210.
- Ho, C. L., Martys, J. L., Mikhailov, A., Gundersen, G. G. and Liem, R. K. (1998). Novel features of intermediate filament dynamics revealed by green fluorescent protein chimeras. *J Cell Sci* **111** (Pt 13), 1767-1778.
- Holtz, D., Tanaka, R. A., Hartwig, J. and McKeon, F. (1989). The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* **59**, 969-977.
- Honore, S., Pasquier, E. and Braguer, D. (2005). Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* **62**, 3039-3056.
- Huang, B., Chen, S. C. and Wang, D. L. (2009). Shear flow increases S-nitrosylation of proteins in endothelial cells. *Cardiovasc Res* **83**, 536-546.
- Hubner, S., Eam, J. E., Wagstaff, K. M. and Jans, D. A. (2006). Quantitative analysis of localization and nuclear aggregate formation induced by GFP-lamin A mutant proteins in living HeLa cells. *J Cell Biochem* **98**, 810-826.
- Huitorel, P. and Pantaloni, D. (1985). Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur J Biochem* **150**, 265-269.
- Hyman, A., Yim, C., Krajden, M., Read, S., Basinski, A. S., Wanless, I., Levy, G. and Heathcote, J. (1999). Oral prostaglandin (PGE2) therapy for chronic viral hepatitis B and C. *J Viral Hepat* **6**, 329-336.
- Ianaro, A., Ialenti, A., Maffia, P., Di Meglio, P., Di Rosa, M. and Santoro, M. G. (2003). Anti-inflammatory activity of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and 2-cyclopenten-1-one: role of the heat shock response. *Mol Pharmacol* **64**, 85-93.
- Ikai, K., Kudo, H., Toda, K. and Fukushima, M. (1998). Induction of apoptosis, p53 and heme oxygenase-1 by cytotoxic prostaglandin delta12-PGJ2 in transformed endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **58**, 295-300.
- Ishikawa, T., Akimaru, K., Nakanishi, M., Tomokiyo, K., Furuta, K., Suzuki, M. and Noyori, R. (1998). Anti-cancer-prostaglandin-induced cell-cycle arrest and its modulation by an inhibitor of the ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump (GS-X pump). *Biochem J* **336** (Pt 3), 569-576.
- Isom, A. L., Barnes, S., Wilson, L., Kirk, M., Coward, L. and Darley-Usmar, V. (2004). Modification of Cytochrome c by 4-hydroxy-2-nonenal: evidence for histidine, lysine, and arginine-aldehyde adducts. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**, 1136-1147.
- Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K. and Yamamoto, M. (2004). Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). *Mol Cell Biol* **24**, 36-45.
- Ji, J. D., Kim, H. J., Rho, Y. H., Choi, S. J., Lee, Y. H., Cheon, H. J., Sohn, J. and Song, G. G. (2005). Inhibition of IL-10-induced STAT3 activation by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 983-988.
- Jiang, C., Ting, A. T. and Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**, 82-86.
- Jones, B. E., Beechem, J. M. and Matthews, C. R. (1995). Local and global dynamics during the folding of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 1867-1877.
- Jozkowicz, A., Nigisch, A., Wegrzyn, J., Weigel, G., Huk, I. and Dulak, J. (2004). Opposite effects of prostaglandin-J2 on VEGF in normoxia and hypoxia: role of HIF-1. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 31-38.

- Jozkowicz, A., Was, H. and Dulak, J. (2007).** Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal* **9**, 2099-2117.
- Kalia, S. K., Kalia, L. V. and McLean, P. J. (2010).** Molecular chaperones as rational drug targets for Parkinson's disease therapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **9**, 741-753.
- Kane, C. D. and Bernlohr, D. A. (1996).** A simple assay for intracellular lipid-binding proteins using displacement of 1-anilinonaphthalene 8-sulfonic acid. *Anal Biochem* **233**, 197-204.
- Kansanen, E., Kivela, A. M. and Levonen, A. L. (2009).** Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Free Radic Biol Med* **47**, 1310-1317.
- Kato, T., Fukushima, M., Kurozumi, S. and Noyori, R. (1986).** Antitumor activity of delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J2 in vitro and in vivo. *Cancer Res* **46**, 3538-3542.
- Kersten, S., Desvergne, B. and Wahli, W. (2000).** Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405**, 421-424.
- Keshavarzian, A., Banan, A., Farhadi, A., Komanduri, S., Mutlu, E., Zhang, Y. and Fields, J. Z. (2003).** Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **52**, 720-728.
- Kikawa, Y., Narumiya, S., Fukushima, M., Wakatsuka, H. and Hayaishi, O. (1984).** 9-Deoxy-delta 9, delta 12-13,14-dihydroprostaglandin D2, a metabolite of prostaglandin D2 formed in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1317-1321.
- Kikuchi, Y., Kita, T., Miyauchi, M., Hirata, J., Sasa, H., Nagata, I. and Fukushima, M. (1992).** Adjuvant effects of antineoplastic prostaglandins to cisplatin in nude mice bearing human ovarian cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **118**, 453-457.
- Kim, D. H., Kim, E. H., Na, H. K., Sun, Y. and Surh, Y. J. (2010).** 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) stabilizes, but functionally inactivates p53 by binding to the cysteine 277 residue. *Oncogene* **29**, 2560-2576.
- Kim, E. H., Na, H. K. and Surh, Y. J. (2006).** Upregulation of VEGF by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 via heme oxygenase-1 and ERK1/2 signaling in MCF-7 cells. *Ann N Y Acad Sci* **1090**, 375-384.
- Kim, E. H. and Surh, Y. J. (2006).** 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochem Pharmacol* **72**, 1516-1528.
- Kim, H. J., Kim, J. Y., Meng, Z., Wang, L. H., Liu, F., Conrads, T. P., Burke, T. R., Veenstra, T. D. and Farrar, W. L. (2007a).** 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits transcriptional activity of estrogen receptor-alpha via covalent modification of DNA-binding domain. *Cancer Res* **67**, 2595-2602.
- Kim, H. J., Rho, Y. H., Choi, S. J., Lee, Y. H., Cheon, H., Um, J. W., Sohn, J., Song, G. G. and Ji, J. D. (2005).** 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2 inhibits IL-6-induced Stat3 phosphorylation in lymphocytes. *Exp Mol Med* **37**, 179-185.
- Kim, H. S., Lee, J. H. and Kim, I. K. (1996).** Intracellular glutathione level modulates the induction of apoptosis by delta 12-prostaglandin J2. *Prostaglandins* **51**, 413-425.
- Kim, S. J., Yoo, B. C., Uhm, C. S. and Lee, S. W. (2011).** Posttranslational arginine methylation of lamin A/C during myoblast fusion. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 308-317.
- Kim, W. J., Kim, J. H. and Jang, S. K. (2007b).** Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A. *EMBO J* **26**, 5020-5032.
- Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C. and Lehmann, J. M. (1995).** A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813-819.
- Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y. and Yamamoto, M. (2009).** The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol Cell Biol* **29**, 493-502.
- Koizumi, T., Negishi, M. and Ichikawa, A. (1992).** Induction of heme oxygenase by delta 12-prostaglandin J2 in porcine aortic endothelial cells. *Prostaglandins* **43**, 121-131.
- Kokkinos, M. I., Wafai, R., Wong, M. K., Newgreen, D. F., Thompson, E. W. and Waltham, M. (2007).** Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs* **185**, 191-203.
- Kondo, M., Shibata, T., Kumagai, T., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Sasaki, S., Iwata, M., Noguchi, N. and Uchida, K. (2002).** 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2): the endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7367-7372.

- Krohne, G., Waizenegger, I. and Hoger, T. H. (1989). The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J Cell Biol* **109**, 2003-2011.
- Lamberti, A., Caraglia, M., Longo, O., Marra, M., Abbruzzese, A. and Arcari, P. (2004). The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: review article. *Amino Acids* **26**, 443-448.
- Landar, A., Shiva, S., Levonen, A. L., Oh, J. Y., Zaragoza, C., Johnson, M. S. and Darley-Usmar, V. M. (2006). Induction of the permeability transition and cytochrome c release by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in mitochondria. *Biochem J* **394**, 185-195.
- Landino, L. M., Moynihan, K. L., Todd, J. V. and Kennett, K. L. (2004). Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 555-560.
- Lee, T. S., Tsai, H. L. and Chau, L. Y. (2003). Induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages is essential for the anti-inflammatory effect of low dose 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* **278**, 19325-19330.
- Legault, J., Gaulin, J. F., Mounetou, E., Bolduc, S., Lacroix, J., Poyet, P. and Gaudreault, R. C. (2000). Microtubule disruption induced in vivo by alkylation of beta-tubulin by 1-aryl-3-(2-chloroethyl)ureas, a novel class of soft alkylating agents. *Cancer Res* **60**, 985-992.
- Lek, M. and North, K. N. (2010). Are biological sensors modulated by their structural scaffolds? The role of the structural muscle proteins alpha-actinin-2 and alpha-actinin-3 as modulators of biological sensors. *FEBS Lett* **584**, 2974-2980.
- Levin, G., Duffin, K. L., Obukowicz, M. G., Hummert, S. L., Fujiwara, H., Needleman, P. and Raz, A. (2002). Differential metabolism of dihomo-gamma-linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E1 and prostaglandin E2. *Biochem J* **365**, 489-496.
- Levonen, A. L., Dickinson, D. A., Moellering, D. R., Mulcahy, R. T., Forman, H. J. and Darley-Usmar, V. M. (2001). Biphasic effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 1846-1851.
- Levonen, A. L., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E. K., Dickinson, D. A., Zanoni, G., Morrow, J. D. and Darley-Usmar, V. M. (2004). Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* **378**, 373-382.
- Liu, H., Li, W., Ahmad, M., Miller, T. M., Rose, M. E., Poloyac, S. M., Uechi, G., Balasubramani, M., Hickey, R. W. and Graham, S. H. (2011). Modification of ubiquitin-C-terminal hydrolase-L1 by cyclopentenone prostaglandins exacerbates hypoxic injury. *Neurobiol Dis* **41**, 318-328.
- Liu, J. D., Lin, S. Y., Ho, Y. S., Pan, S., Hung, L. F., Tsai, S. H., Lin, J. K. and Liang, Y. C. (2003). Involvement of c-jun N-terminal kinase activation in 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-and prostaglandin A1-induced apoptosis in AGS gastric epithelial cells. *Mol Carcinog* **37**, 16-24.
- Maltese, W. A. (1990). Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J* **4**, 3319-3328.
- Mann, M. and Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**, 255-261.
- Markiewicz, E., Tilgner, K., Barker, N., van de Wetering, M., Clevers, H., Dorobek, M., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Ramaekers, F. C., Broers, J. L., Blankesteijn, W. M., Salpingidou, G., Wilson, R. G., Ellis, J. A. and Hutchison, C. J. (2006). The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *EMBO J* **25**, 3275-3285.
- Martinez-Ruiz, A., Villanueva, L., Gonzalez de Orduna, C., Lopez-Ferrer, D., Higuera, M. A., Tarin, C., Rodriguez-Crespo, I., Vazquez, J. and Lamas, S. (2005). S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8525-8530.
- Marx, N., Schonbeck, U., Lazar, M. A., Libby, P. and Plutsky, J. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **83**, 1097-1103.
- Mathews, C. and Van Holde, K. (2000). *Biochemistry*. Capítulo 19, 764-769. (Segunda edición) McGraw-Hill Interamericana.

- McClay, E. F., Winski, P. J., Jones, J. A., Jennerette, J., 3rd and Gattoni-Celli, S. (1996).** delta 12-Prostaglandin-J2 is cytotoxic in human malignancies and synergizes with both cisplatin and radiation. *Cancer Res* **56**, 3866-3869.
- Meyer-Siegler, K., Mauro, D. J., Seal, G., Wurzer, J., deRiel, J. K. and Sirover, M. A. (1991).** A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8460-8464.
- Minin, A. A. and Moldaver, M. V. (2008).** Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution. *Biochemistry (Mosc)* **73**, 1453-1466.
- Miyamoto, T., Yamamoto, S. and Hayaishi, O. (1974).** Prostaglandin synthetase system--resolution into oxygenase and isomerase components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 3645-3648.
- Mohr, S., Hallak, H., de Boitte, A., Lapetina, E. G. and Brune, B. (1999).** Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* **274**, 9427-9430.
- Mohr, S., Stamler, J. S. and Brune, B. (1996).** Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J Biol Chem* **271**, 4209-4214.
- Moos, P. J., Edes, K., Cassidy, P., Massuda, E. and Fitzpatrick, F. A. (2003).** Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox-sensitive transcription factors p53 and hypoxia-inducible factor by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **278**, 745-750.
- Moos, P. J., Edes, K. and Fitzpatrick, F. A. (2000).** Inactivation of wild-type p53 tumor suppressor by electrophilic prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9215-9220.
- Moriai, M., Tsuji, N., Kobayashi, D., Kuribayashi, K. and Watanabe, N. (2009).** Down-regulation of hTERT expression plays an important role in 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* **34**, 1363-1372.
- Mossakowska, M., Moraczewska, J., Khaitlina, S. and Strzelecka-Golaszewska, H. (1993).** Proteolytic removal of three C-terminal residues of actin alters the monomer-monomer interactions. *Biochem J* **289** (Pt 3), 897-902.
- Muchir, A., Pavlidis, P., Bonne, G., Hayashi, Y. K. and Worman, H. J. (2007a).** Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **16**, 1884-1895.
- Muchir, A., Pavlidis, P., Decostre, V., Herron, A. J., Arimura, T., Bonne, G. and Worman, H. J. (2007b).** Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Clin Invest* **117**, 1282-1293.
- Muchir, A., Shan, J., Bonne, G., Lehnart, S. E. and Worman, H. J. (2009).** Inhibition of extracellular signal-regulated kinase signaling to prevent cardiomyopathy caused by mutation in the gene encoding A-type lamins. *Hum Mol Genet* **18**, 241-247.
- Murakami, M., Nakatani, Y., Kuwata, H. and Kudo, I. (2000).** Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A(2)s. *Biochim Biophys Acta* **1488**, 159-166.
- Nakagawa, T., Hirano, Y., Inomata, A., Yokota, S., Miyachi, K., Kaneda, M., Umeda, M., Furukawa, K., Omata, S. and Horigome, T. (2003).** Participation of a fusogenic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in nuclear membrane assembly. *J Biol Chem* **278**, 20395-20404.
- Nardai, G., Sass, B., Eber, J., Orosz, G. and Csermely, P. (2000).** Reactive cysteines of the 90-kDa heat shock protein, Hsp90. *Arch Biochem Biophys* **384**, 59-67.
- Narumiya, S. (2009).** Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. *J Mol Med* **87**, 1015-1022.
- Narumiya, S. and Fukushima, M. (1986).** Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. I. Active transport and intracellular accumulation of cyclopentenone prostaglandins, a reaction leading to growth inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* **239**, 500-505.
- Narumiya, S., Ohno, K., Fujiwara, M. and Fukushima, M. (1986).** Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. II. Temperature-dependent transfer of a cyclopentenone prostaglandin to nuclei. *J Pharmacol Exp Ther* **239**, 506-511.
- Narumiya, S., Ohno, K., Fukushima, M. and Fujiwara, M. (1987).** Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 in nuclei. *J Pharmacol Exp Ther* **242**, 306-311.

- Narumiya, S. and Toda, N. (1985). Different responsiveness of prostaglandin D2-sensitive systems to prostaglandin D2 and its analogues. *Br J Pharmacol* **85**, 367-375.
- Nguyen, T., Nioi, P. and Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* **284**, 13291-13295.
- Nieminen, M., Henttinen, T., Merinen, M., Marttila-Ichihara, F., Eriksson, J. E. and Jalkanen, S. (2006). Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* **8**, 156-162.
- Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K. and Milburn, M. V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* **395**, 137-143.
- Norel, X. (2007). Prostanoid receptors in the human vascular wall. *ScientificWorldJournal* **7**, 1359-1374.
- Noyori, R. and Suzuki, M. (1993). Organic synthesis of prostaglandins: advancing biology. *Science* **259**, 44-45.
- Nugteren, D. H. and Hazelhof, E. (1973). Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **326**, 448-461.
- Oh, J. Y., Giles, N., Landar, A. and Darley-Usmar, V. (2008). Accumulation of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 adduct formation with Keap1 over time: effects on potency for intracellular antioxidant defence induction. *Biochem J* **411**, 297-306.
- Ohno, K., Higaki, J., Takechi, S. and Hirata, M. (1990). Specific role of an alpha,beta-unsaturated carbonyl group in gamma-glutamylcysteine synthetase induction by prostaglandin A2. *Chem Biol Interact* **76**, 77-87.
- Ohno, K. and Hirata, M. (1990). Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by prostaglandin A2 in L-1210 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **168**, 551-557.
- Osburn, W. O. and Kensler, T. W. (2008). Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res* **659**, 31-39.
- Otey, C. A. and Carpen, O. (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**, 104-111.
- Paramio, J. M. and Jorcano, J. L. (2002). Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *Bioessays* **24**, 836-844.
- Parker, J. (1995). Prostaglandin A2 protein interactions and inhibition of cellular proliferation. *Prostaglandins* **50**, 359-375.
- Paumi, C. M., Wright, M., Townsend, A. J. and Morrow, C. S. (2003). Multidrug resistance protein (MRP) 1 and MRP3 attenuate cytotoxic and transactivating effects of the cyclopentenone prostaglandin, 15-deoxy-Delta(12,14)prostaglandin J2 in MCF7 breast cancer cells. *Biochemistry* **42**, 5429-5437.
- Pereira, S., Bourgeois, P., Navarro, C., Esteves-Vieira, V., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A. and Levy, N. (2008). HGPS and related premature aging disorders: from genomic identification to the first therapeutic approaches. *Mech Ageing Dev* **129**, 449-459.
- Perez-Sala, D., Cernuda-Morollon, E. and Canada, F. J. (2003). Molecular basis for the direct inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* **278**, 51251-51260.
- Petrova, T. V., Akama, K. T. and Van Eldik, L. J. (1999). Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4668-4673.
- Pignatelli, M., Sanchez-Rodriguez, J., Santos, A. and Perez-Castillo, A. (2005). 15-deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2 induces programmed cell death of breast cancer cells by a pleiotropic mechanism. *Carcinogenesis* **26**, 81-92.
- Piva, R., Gianferretti, P., Ciucci, A., Taulli, R., Belardo, G. and Santoro, M. G. (2005). 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis in human malignant B cells: an effect associated with inhibition of NF-kappa B activity and down-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood* **105**, 1750-1758.
- Ponferrada, A., Caso, J. R., Alou, L., Colon, A., Sevillano, D., Moro, M. A., Lizasoain, I., Menchen, P., Gomez-Lus, M. L., Lorenzo, P., Cos, E., Leza, J. C. and Menchen, L. (2007). The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology* **132**, 1791-1803.
- Pugh, G. E., Coates, P. J., Lane, E. B., Raymond, Y. and Quinlan, R. A. (1997). Distinct nuclear assembly pathways for lamins A and C lead to their increase during quiescence in Swiss 3T3 cells. *J Cell Sci* **110** (Pt 19), 2483-2493.

- Rajakariar, R., Hilliard, M., Lawrence, T., Trivedi, S., Colville-Nash, P., Bellingan, G., Fitzgerald, D., Yaqoob, M. M. and Gilroy, D. W. (2007).** Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12,14-PGJ2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20979-20984.
- Rang, H. P., Dale, M. M. and Ritter, J. M. (2000).** *Pharmacology*. Capítulo 26, 479-482. (Cuarta edición) Harcourt Internacional
- Rao, L., Perez, D. and White, E. (1996).** Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* **135**, 1441-1455.
- Renedo, M., Gayarre, J., Garcia-Dominguez, C. A., Perez-Rodriguez, A., Prieto, A., Canada, F. J., Rojas, J. M. and Perez-Sala, D. (2007).** Modification and activation of Ras proteins by electrophilic prostanoids with different structure are site-selective. *Biochemistry* **46**, 6607-6616.
- Ricote, M., Huang, J. T., Welch, J. S. and Glass, C. K. (1999).** The peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol* **66**, 733-739.
- Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. and Glass, C. K. (1998).** The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79-82.
- Robbins, A. R., Ward, R. D. and Oliver, C. (1995).** A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells. *J Cell Biol* **130**, 1093-1104.
- Roberts, L. J., 2nd and Morrow, J. D. (1994).** Isoprostanes. Novel markers of endogenous lipid peroxidation and potential mediators of oxidant injury. *Ann N Y Acad Sci* **744**, 237-242.
- Rocchi, S. y Auwerx, J. (1999).** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: a versatile metabolic regulator. *Ann Med* **31**, 342-351.
- Rogers, K. R., Herrmann, H. and Franke, W. W. (1996).** Characterization of disulfide crosslink formation of human vimentin at the dimer, tetramer, and intermediate filament levels. *J Struct Biol* **117**, 55-69.
- Rogers, K. R., Morris, C. J. and Blake, D. R. (1989).** Cytoskeletal rearrangement by oxidative stress. *Int J Tissue React* **11**, 309-314.
- Rosales, T. and Royer, C. A. (2008).** A graphical user interface for BIOEQS: a program for simulating and analyzing complex biomolecular interactions. *Anal Biochem* **381**, 270-272.
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. and Spiegelman, B. M. (2000).** Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* **14**, 1293-1307.
- Rossi, A., Elia, G. and Santoro, M. G. (1997).** Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: an effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 746-750.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M. and Santoro, M. G. (2000).** Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I-kappaB kinase. *Nature* **403**, 103-108.
- Rossi, A. and Santoro, M. G. (1995).** Induction by prostaglandin A1 of haem oxygenase in myoblastic cells: an effect independent of expression of the 70 kDa heat shock protein. *Biochem J* **308** (Pt 2), 455-463.
- Royer, C. A., Smith, W. R. and Beechem, J. M. (1990).** Analysis of binding in macromolecular complexes: a generalized numerical approach. *Anal Biochem* **191**, 287-294.
- Sanchez-Gomez, F. J., Cernuda-Morollon, E., Stamatakis, K. and Perez-Sala, D. (2004).** Protein thiol modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol* **66**, 1349-1358.
- Sanchez-Gomez, F. J., Diez-Dacal, B., Pajares, M. A., Llorca, O. and Perez-Sala, D. (2010).** Cyclopentenone prostaglandins with dienone structure promote cross-linking of the chemoresistance-inducing enzyme glutathione transferase P1-1. *Mol Pharmacol* **78**, 723-733.
- Santoro, M. G. (1994).** Heat shock proteins and virus replication: hsp70s as mediators of the antiviral effects of prostaglandins. *Experientia* **50**, 1039-1047.
- Santoro, M. G. (1997).** Antiviral activity of cyclopentenone prostanoids. *Trends Microbiol* **5**, 276-281.
- Santoro, M. G. (2000).** Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* **59**, 55-63.
- Santoro, M. G., Crisari, A., Benedetto, A. and Amici, C. (1986).** Modulation of the growth of a human erythroleukemic cell line (K562) by prostaglandins: antiproliferative action of prostaglandin A. *Cancer Res* **46**, 6073-6077.

- Santoro, M. G., Favalli, C., Mastino, A., Jaffe, B. M., Esteban, M. and Garaci, E. (1988).** Antiviral activity of a synthetic analog of prostaglandin A in mice infected with influenza A virus. *Arch Virol* **99**, 89-100.
- Sarge, K. D. and Park-Sarge, O. K. (2009).** Sumoylation and human disease pathogenesis. *Trends Biochem Sci* **34**, 200-205.
- Sarria, A. J., Lieber, J. G., Nordeen, S. K. and Evans, R. M. (1994).** The presence or absence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cells. *J Cell Sci* **107** (Pt 6), 1593-1607.
- Sarria, A. J., Nordeen, S. K. and Evans, R. M. (1990).** Regulated expression of vimentin cDNA in cells in the presence and absence of a preexisting vimentin filament network. *J Cell Biol* **111**, 553-565.
- Sasaki, H. and Fukushima, M. (1994).** Prostaglandins in the treatment of cancer. *Anticancer Drugs* **5**, 131-138.
- Sasaki, H., Niimi, S., Akiyama, M., Tanaka, T., Hazato, A., Kurozumi, S., Fukushima, S. and Fukushima, M. (1999).** Antitumor activity of 13,14-dihydro-15-deoxy-delta7-prostaglandin-A1-methyl ester integrated into lipid microspheres against human ovarian carcinoma cells resistant to cisplatin in vivo. *Cancer Res* **59**, 3919-3922.
- Sawyer, N., Cauchon, E., Chateauneuf, A., Cruz, R. P., Nicholson, D. W., Metters, K. M., O'Neill, G. P. and Gervais, F. G. (2002).** Molecular pharmacology of the human prostaglandin D2 receptor, CRTH2. *Br J Pharmacol* **137**, 1163-1172.
- Schaffeld, M., Herrmann, H., Schultess, J. and Markl, J. (2001).** Vimentin and desmin of a cartilaginous fish, the shark *Scyliorhinus stellaris*: sequence, expression patterns and in vitro assembly. *Eur J Cell Biol* **80**, 692-702.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. and Schaffner, W. (1989).** Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**, 6419.
- Schuster, V. L. (1998).** Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* **60**, 221-242.
- Schweitzer, S. C. and Evans, R. M. (1998).** Vimentin and lipid metabolism. *Subcell Biochem* **31**, 437-462.
- Shan, B., Medina, J. C., Santha, E., Frankmoelle, W. P., Chou, T. C., Learned, R. M., Narbut, M. R., Stott, D., Wu, P., Jaen, J. C., Rosen, T., Timmermans, P. B. and Beckmann, H. (1999).** Selective, covalent modification of beta-tubulin residue Cys-239 by T138067, an antitumor agent with in vivo efficacy against multidrug-resistant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5686-5691.
- Shan, Z. Z., Masuko-Hongo, K., Dai, S. M., Nakamura, H., Kato, T. and Nishioka, K. (2004).** A potential role of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. *J Biol Chem* **279**, 37939-37950.
- Shibata, T., Yamada, T., Ishii, T., Kumazawa, S., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J. and Uchida, K. (2003a).** Thioredoxin as a molecular target of cyclopentenone prostaglandins. *J Biol Chem* **278**, 26046-26054.
- Shibata, T., Yamada, T., Kondo, M., Tanahashi, N., Tanaka, K., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J. and Uchida, K. (2003b).** An endogenous electrophile that modulates the regulatory mechanism of protein turnover: inhibitory effects of 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 on proteasome. *Biochemistry* **42**, 13960-13968.
- Shin, S. W., Seo, C. Y., Han, H., Han, J. Y., Jeong, J. S., Kwak, J. Y. and Park, J. I. (2009).** 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. *Clin Cancer Res* **15**, 5414-5425.
- Shiraki, T., Kamiya, N., Shiki, S., Kodama, T. S., Kakizuka, A. and Jingami, H. (2005).** Alpha,beta-unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **280**, 14145-14153.
- Sinclair, S. B., Greig, P. D., Blendis, L. M., Abecassis, M., Roberts, E. A., Phillips, M. J., Cameron, R. and Levy, G. A. (1989).** Biochemical and clinical response of fulminant viral hepatitis to administration of prostaglandin E. A preliminary report. *J Clin Invest* **84**, 1063-1069.
- Sjoblom, B., Salmazo, A. and Djinoovic-Carugo, K. (2008).** Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2688-2701.
- Soti, C., Nagy, E., Giricz, Z., Vigh, L., Csermely, P. and Ferdinandy, P. (2005).** Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol* **146**, 769-780.

- Stamatakis, K., Sanchez-Gomez, F. J. and Perez-Sala, D. (2006).** Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ in mesangial cells reveals multiple interactions with the cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol* **17**, 89-98.
- Straus, D. S. and Glass, C. K. (2001).** Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* **21**, 185-210.
- Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C. H., Sengchanthalangsy, L. L., Ghosh, G. and Glass, C. K. (2000).** 15-deoxy-delta^{12,14}-prostaglandin J₂ inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4844-4849.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H. and Aebi, U. (2003).** Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* **25**, 243-251.
- Stryer, L. (1965).** The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J Mol Biol* **13**, 482-495.
- Styers, M. L., Kowalczyk, A. P. and Faundez, V. (2005).** Intermediate filaments and vesicular membrane traffic: the odd couple's first dance? *Traffic* **6**, 359-365.
- Sugiura, S., Toru, T., Tanaka, T., Hazato, A., Okamura, N., Bannai, K., Manabe, K., Kurozumi, S. and Noyori, R. (1984).** Synthesis of new antineoplastic prostaglandins. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **32**, 4658-4661.
- Suzuki, M., Kiho, T., Furuta, K., Fukushima, S., Takeuchi, Y. and Noyori, R. (1997a).** Delta⁷-prostaglandin C₁: a primary metabolite of antitumor Delta⁷-prostaglandin A₁ in sera. *Tetrahedron* **53**, 17009-17014.
- Suzuki, M., Mori, M., Niwa, T., Hirata, R., Furuta, K., Ishikawa, T. and Noyori, R. (1997b).** Chemical implications for antitumor and antiviral prostaglandins: reaction of Delta⁷-prostaglandin A₁ and prostaglandin A₁ methyl esters with thiols. *J Am Chem Soc* **119**, 2376-2385.
- Takahashi, N., Mizuno, Y., Kozai, D., Yamamoto, S., Kiyonaka, S., Shibata, T., Uchida, K. and Mori, Y. (2008).** Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* **2**, 287-298.
- Tanaka, A., Matsuoka, H., Nishino, H. and Imanishi, J. (1986).** Antiherpetic action of prostaglandin D₂. *Prostaglandins Leukot Med* **25**, 131-138.
- Tang, D. D. (2008).** Intermediate filaments in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C869-878.
- Tanikawa, M., Yamada, K., Tominaga, K., Morisaki, H., Kaneko, Y., Ikeda, K., Suzuki, M., Kiho, T., Tomokiyo, K., Furuta, K., Noyori, R. and Nakanishi, M. (1998).** Potent prostaglandin A₁ analogs that suppress tumor cell growth through induction of p21 and reduction of cyclin E. *J Biol Chem* **273**, 18522-18527.
- Tisdale, E. J. (2002).** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota /lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. *J Biol Chem* **277**, 3334-3341.
- Tisdale, E. J. and Artalejo, C. R. (2006).** Src-dependent aprotein kinase C iota/lambda (aPKCiota/lambda) tyrosine phosphorylation is required for aPKCiota/lambda association with Rab2 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on pre-golgi intermediates. *J Biol Chem* **281**, 8436-8442.
- Tisdale, E. J., Kelly, C. and Artalejo, C. R. (2004).** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity. *J Biol Chem* **279**, 54046-54052.
- Toivola, D. M., Tao, G. Z., Habtezion, A., Liao, J. and Omary, M. B. (2005).** Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol* **15**, 608-617.
- Uchida, K. (2000).** Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* **28**, 1685-1696.
- Uchida, K. (2003).** 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* **42**, 318-343.
- Van Berlo, J. H., Voncken, J. W., Kubben, N., Broers, J. L., Duisters, R., van Leeuwen, R. E., Crijns, H. J., Ramaekers, F. C., Hutchison, C. J. and Pinto, Y. M. (2005).** A-type lamins are essential for TGF-beta₁ induced PP2A to dephosphorylate transcription factors. *Hum Mol Genet* **14**, 2839-2849.
- van Iersel, M. L., Cnubben, N. H., Smink, N., Koeman, J. H. and van Bladeren, P. J. (1999).** Interactions of prostaglandin A₂ with the glutathione-mediated biotransformation system. *Biochem Pharmacol* **57**, 1383-1390.

- Vlcek, S. and Foisner, R. (2007). A-type lamin networks in light of laminopathic diseases. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 661-674.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Vunta, H., Davis, F., Palempalli, U. D., Bhat, D., Arner, R. J., Thompson, J. T., Peterson, D. G., Reddy, C. C. and Prabhu, K. S. (2007). The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages. *J Biol Chem* **282**, 17964-17973.
- Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Fujimoto, Y., Maebara, K., Kamiya, N., Jingami, H. and Morikawa, K. (2009a). Structural insight into PPARgamma activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *J Mol Biol* **385**, 188-199.
- Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T. and Morikawa, K. (2009b). Atomic structure of mutant PPARgamma LBD complexed with 15d-PGJ2: novel modulation mechanism of PPARgamma/RXRalpha function by covalently bound ligands. *FEBS Lett* **583**, 320-324.
- Walsh, J. L., Keith, T. J. and Knoll, H. R. (1989). Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochim Biophys Acta* **999**, 64-70.
- Wang, G., Gao, Y. and Geng, M. L. (2006). Analysis of heterogeneous fluorescence decays in proteins. Using fluorescence lifetime of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate to probe apomyoglobin unfolding at equilibrium. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 1125-1137.
- Wang, Z., Pandey, A. and Hart, G. W. (2007). Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1365-1379.
- Ward, G. E. and Kirschner, M. W. (1990). Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* **61**, 561-577.
- Wayman, N. S., Hattori, Y., McDonald, M. C., Mota-Filipe, H., Cuzzocrea, S., Pisano, B., Chatterjee, P. K. and Thiemermann, C. (2002). Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size. *FASEB J* **16**, 1027-1040.
- West, M. B., Hill, B. G., Xuan, Y. T. and Bhatnagar, A. (2006). Protein glutathiolation by nitric oxide: an intracellular mechanism regulating redox protein modification. *FASEB J* **20**, 1715-1717.
- Worman, H. J., Ostlund, C. and Wang, Y. (2010). Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000760.
- Wright, D. H., Metters, K. M., Abramovitz, M. and Ford-Hutchinson, A. W. (1998). Characterization of the recombinant human prostanoid DP receptor and identification of L-644,698, a novel selective DP agonist. *Br J Pharmacol* **123**, 1317-1324.
- Xu, X. H., Hua, Y. N., Zhang, H. L., Wu, J. C., Miao, Y. Z., Han, R., Gu, Z. L. and Qin, Z. H. (2007). Greater stress protein expression enhanced by combined prostaglandin A1 and lithium in a rat model of focal ischemia. *Acta Pharmacol Sin* **28**, 1097-1104.
- Yamaguchi, S., Aldini, G., Ito, S., Morishita, N., Shibata, T., Vistoli, G., Carini, M. and Uchida, K. (2010). Delta12-prostaglandin J2 as a product and ligand of human serum albumin: formation of an unusual covalent adduct at His146. *J Am Chem Soc* **132**, 824-832.
- Yan, X. D., Kumar, B., Nahreini, P., Hanson, A. J., Prasad, J. E. and Prasad, K. N. (2005). Prostaglandin-induced neurodegeneration is associated with increased levels of oxidative markers and reduced by a mixture of antioxidants. *J Neurosci Res* **81**, 85-90.
- Yoon, M., Moir, R. D., Prahlad, V. and Goldman, R. D. (1998). Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J Cell Biol* **143**, 147-157.
- Yu, K., Bayona, W., Kallen, C. B., Harding, H. P., Ravera, C. P., McMahon, G., Brown, M. and Lazar, M. A. (1995). Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* **270**, 23975-23983.
- Zhang, X., Lu, L., Dixon, C., Wilmer, W., Song, H., Chen, X. and Rovin, B. H. (2004). Stress protein activation by the cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in human mesangial cells. *Kidney Int* **65**, 798-810.
- Zhang, Y. Q. and Sarge, K. D. (2008). Sumoylation regulates lamin A function and is lost in lamin A mutants associated with familial cardiomyopathies. *J Cell Biol* **182**, 35-39.
- Zheng, L., Roeder, R. G. and Luo, Y. (2003). S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* **114**, 255-266.
- Zia, P., Golub, M. and Horton, R. (1975). A radioimmunoassay for prostaglandin A1 in human peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* **41**, 245-252.

- Ziboh, V. A., Miller, C. C. and Cho, Y. (2000).** Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am J Clin Nutr* **71**, 361S-366S.
- Zingarelli, B., Sheehan, M., Hake, P. W., O'Connor, M., Denenberg, A. and Cook, J. A. (2003).** Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol* **171**, 6827-6837.
- Zmijewski, J. W., Landar, A., Watanabe, N., Dickinson, D. A., Noguchi, N. and Darley-USmar, V. M. (2005).** Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem Soc Trans* **33**, 1385-1389.
- Zorrilla, S., Garzon, B. and Perez-Sala, D. (2010).** Selective binding of the fluorescent dye 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid to peroxisome proliferator-activated receptor gamma allows ligand identification and characterization. *Anal Biochem* **399**, 84-92.

ANEXO

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

